UNIVERSITE SCIENTIFIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE

FACULTE DE MEDECINE

Domaine de la Merci - LA TRONCHE

ANNEE 1973 N° D'ORDRE : 57

CULTURE IN VITRO DES CELLULES HEMATOPOIETIQUES EN GEL D'AGAR
APPLICATIONS AUX LEUCEMIES MYELOIDES HUMAINES

THÈSE

présentée à l'Université Scientifique et Médicale
de GRENOBLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MEDECINE
DIPLOME D'ETAT

par

Monsieur Daniel SEIGNEURIN
Interne des Hôpitaux
né le 11 octobre 1945 à LA TRONCHE

Cette thèse sera soutenue publiquement le 7 juillet 1973 devant

Y. MAZARE, Président du Jury
F. STREIFF
D. HOLLARD
L. KOLODIE

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE

FACULTE DE MEDECINE

Domaine de la Merci - LA TRONCHE

ANNEE 1973

N° D'ORDRE :

CULTURE IN VITRO DES CELLULES HEMATOPOIETIQUES EN GEL D'AGAR APPLICATIONS AUX LEUCEMIES MYELOIDES HUMAINES

THÈSE

présentée à l'Université Scientifique et Médicale de GRENOBLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MEDECINE
DIPLOME D'ETAT

par

Monsieur Daniel SEIGNEURIN
Interne des Hôpitaux
né le 11 octobre 1945 à LA TRONCHE

Cette thèse sera soutenue publiquement le 7 juillet 1973 devant

Y. MAZARE, Président du Jury
F. STREIFF
D. HOLLARD
L. KOLODIE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR Y. MAZARE,

Professeur de Clinique Médicale à la Faculté de Médecine de GRENOBLE

qui a bien voulu accepter la présidence de mon jury de thèse.

Je veux lui exprimer ici ma très sincère reconnaissance et mon admiration pour l'équilibre qu'il sait établir entre les nécessités de la science et le respect de l'homme. Ce travail n'a que peu d'implications cliniques actuelles ; j'espère, cependant, ne pas le décevoir.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544319_0043

A MONSIEUR LE PROFESSEUR F. STREIFF

Directeur du Centre Régional de Transfusion Sanguine de NANCY

Je rends hommage à sa haute compétence et à son énergie constructive. Je le remercie respectueusement du grand honneur qu'il me fait en venant à Grenoble pour juger ce travail.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR D. HOLLARD

Durant les années passées dans son Service comme externe puis comme interne, il a permis, par son dynamisme, son enthousiasme pour les idées nouvelles, à mon goût pour l'hématologie, peut-être inné, de se développer et de s'exprimer.

Je lui suis très reconnaissant de m'avoir confié cette étude et je me réjouis de rester dans son équipe.

A MONSIEUR LE DOCTEUR L. KOLODIE

Chef de Travaux d'Hématologie,

dont j'ai pu apprécier les vastes connaissances et la grande compétence technique. Il me fait l'amitié de juger ce travail. Je tiens à lui exprimer ma gratitude.

A MADAME LE DOCTEUR R. BERTHIER

Son aide, sa patience, ses conseils m'ont été très précieux. Dans le cadre de ce travail, c'est elle qui a assuré l'étude des cultures de moelle humaine.

Avec ma très sincère reconnaissance.

A MADEMOISELLE G. MARCILLE
Licencié es Sciences

Elle m'a initié à la technique des cultures cellulaires. Le travail en commun a toujours été agréable et constructif.

Avec ma vive gratitude.

A MONSIEUR M. SUSCILLON
Docteur es Sciences,

qui m'a toujours accueilli dans son laboratoire du C.E.N.G. avec une grande amabilité et qui m'a donné la possibilité d'y travailler pendant 18 mois.

Avec mes sincères remerciements.

A TOUT LE PERSONNEL DES LABORATOIRES D'HEMATOLOGIE DU C.H.R.G. et du C.E.N.G.

DU SERVICE MOIDIEU B

pour leur collaboration et leur aide efficace.

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

EXTERNAT

Monsieur le Professeur J. CABANAC
Monsieur le Professeur D. HOLLARD
Monsieur le Professeur J. ROGET
Monsieur le Docteur M.P. FLANDRIN
Maître de Conférence honoraire
Monsieur le Docteur J. JAUDEL
Maître de Conférence honoraire

INTERNAT

Monsieur le Professeur J. LEDRU
Monsieur le Professeur Y. MAZARE
Monsieur le Professeur D. HOLLARD
Monsieur le Docteur C. VROUSOS
Maître de Conférence agrégé
Monsieur le Professeur M. GEINDRE
Monsieur le Professeur R. SEIGNEURIN

A MA MERE

A MON PERE
le Professeur R. SEIGNEURIN

avec toute mon affection

A MA FEMME

Ce travail est en grande partie le sien.
Avec tout mon amour.

A MON FRERE
Assistant des Hôpitaux - Assistant des Facultés

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

A TOUS MES CAMARADES DE L'INTERNAT

Je dédie ce travail

INTRODUCTION

Les leucémies sont, en pratique médicale, de connaissance relativement récente ; ce n'est qu'à la fin du siècle dernier que leur individualité clinique a été faite, qu'au début du nôtre que leurs aspects morphologiques ont été décrits. Des techniques plus récentes (microscopie électronique, utilisation des isotopes) ont fait progresser la définition de ces malades mais n'ont pas apporté de solutions définitives.

On soupçonne bientôt le rôle essentiel de la cellule souche hématopoïétique, qui pourrait être la cellule cible des agents leucémogènes, et l'intervention de facteurs humoraux régulateurs qui agiraient au début de la différenciation cellulaire ; cela a conduit à l'utilisation de technique d'étude des cellules souches et de leurs descendants immédiats.

La réalisation de ce travail a nécessité la mise au point d'une culture *in vitro* de cellules hématopoïétiques.

Nous avons essayé de préciser les notions apportées par cette technique dans la compréhension de la granulopoïèse physiologique et de la leucémogénèse.

Nous envisagerons successivement :

- les cultures sur agar et la granulopoïèse *in vivo*,
- les cultures formant des colonies en agar,
- les régulateurs de la granulopoïèse,
- les méthodes d'études,
- l'analyse de nos résultats
- la discussion de ceux-ci.

Les abréviations utilisées et certains termes, marqués d'une astérisque*, seront expliqués à la page 143.

CHAPITRE 1

CULTURE SUR AGAR ET GRANULOPOIESE IN VIVO

1.1. GENERALITES

1.2. SCHEMA DE LA GRANULOPOIESE

1.3. APPLICATIONS A L'HOMME : LA LEUCEMOGENESE

Chez l'adulte, la production hématopoïétique est considérable : 2,5 millions d'érythrocytes, 120 000 leucocytes et 5 millions de plaquettes sont déversés chaque seconde dans la circulation d'un sujet normal. Les cellules souches médullaires qui assurent cette production constituent un sujet d'étude fondamental en hématologie.

Un long débat a opposé les partisans de la théorie uniciste (cellule souche totipotentielle) et ceux de la théorie pluraliste (cellule souche spécialisée pour chaque lignée).

Pendant de nombreuses années, ces deux conceptions différentes n'ont été défendues que sur des observations morphologiques.

En 1961, Till et McCulloch (177) décrivent une technique qui permet de reconnaître la cellule souche hématopoiétique (C.S.H.) par ses propriétés fonctionnelles : des cellules médullaires injectées à une souris irradiée à dose léthale forment dans la rate de cet animal des clones de cellules érythroblastiques, granulocytaires et mégacaryocytaires. On a pu montrer que ces clones sont issus de la prolifération et de la différenciation d'une petite fraction des cellules médullaires possédant tous les caractères de la C.S.H.. Malheureusement cette technique n'est utilisable que chez la souris et il n'existe pas, à ce jour, de moyen d'étude direct *in vivo* ou *in vitro* de la C.S.H. humaine. Cependant, la mise au point récente d'une technique de culture en milieu semi-solide a permis de faire de grands progrès dans la compréhension de la granulopoïèse et de ses relations avec les C.S.H..

1.1. GENERALITES SUR LA TECHNIQUE DE CULTURE DES CELLULES HEMATOPOIETIQUES EN GEL D'AGAR

1.1.1. HISTORIQUE

En 1965 et 1966, indépendamment, deux équipes (une israélienne et une australienne) adaptent aux cellules hématopoïétiques (87) (152) une technique de culture *in vitro* des cellules tumorales transformées par le virus du polyome.

Sur une couche de cellules embryonnaires de souris, Pluznick et Sachs (136) ensemencent des cellules spléniques de souris dans un milieu nutritif contenant de l'agar ; vers le 5ème jour d'incubation apparaissent et se développent des colonies de cellules ("mast cells") à différents stades de maturation.

Bradley et Metcalf (16), d'une manière analogue, déposent des cellules médullaires de souris, en suspension dans un milieu contenant de l'agar, sur une couche de cellules rénales de souriceaux nouveau-nés ; des colonies se forment, d'abord composées de cellules granuleuses puis macrophagiques. Ces auteurs rapprochent les résultats de leur technique de ceux de Till et McCulloch, en notant toutefois une différence fondamentale : l'absence *in vitro* des colonies érythroblastiques et mégacaryocytaires.

Cette nouvelle technique s'est révélée par la suite très fructueuse pour la compréhension de la granulopoïèse physiologique et pathologique.

Une réunion internationale, tenue en octobre 1971, a permis de faire le point des connaissances acquises grâce à elle et des problèmes qu'elle soulève.

1.1.2. PRINCIPE DE LA METHODE

Les cellules hématopoïétiques étudiées sont mises en suspension dans un milieu de culture (milieu nutritif additionné d'agar ou de méthyl-

cellulose), liquide à 39° C qui se gélifie à température ambiante. La pousse des colonies dépend d'un facteur stimulant dont l'origine est très variée ; si ce facteur stimulant est apporté sous forme liquide par de l'urine, du sérum ou du milieu conditionné, il est mélangé au milieu de culture ; s'il est apporté par des cellules sécrétrices (leucocytes, cellules embryonnaires, etc.), celles-ci sont incluses dans une couche nutritive semi-solide placée sous la couche des cellules médullaires. Selon la nature du stimulant, il existe donc deux types de culture : l'une monocouche (facteur stimulant liquide), l'autre en double couche (facteur stimulant cellulaire).

Ces deux types de techniques sont utilisables chez l'homme.

1.1.3. INTERET DE LA METHODE

Cette technique permet d'étudier :

- le facteur stimulant la formation des colonies ("Colony-Stimulating Factor" - C.S.F.),

- les cellules médullaires qui sont à l'origine des colonies ("Colony-Forming Cell in Agar" - C.F.C.-A),

- les rapports existant entre les deux types cellulaires rencontrés dans les colonies : cellules des lignées granulocytaire et macrophagique.

Bien que les conditions de culture *in vitro* soient rudimentaires en regard des facteurs complexes réalisés *in vivo*, les connaissances apportées par cette technique sont fondamentales dans la compréhension de la granulopoïèse physiologique et pathologique. Nous rappellerons ici les caractères essentiels de la granulopoïèse *in vivo* et les conceptions actuelles de la leucémogénèse.

1.2. INTEGRATION DES DONNEES DE LA CULTURE SUR AGAR DANS LE SCHEMA DE LA GRANULOPOÏESE

Les données acquises grâce à la technique de culture sur agar permettent de compléter le schéma de la granulopoïèse en introduisant un compartiment supplémentaire, intermédiaire entre celui des cellules souches et le compartiment prolifératif.

D'autres méthodes d'étude (séparation cellulaire en fonction de la densité ou de la vitesse de sédimentation, suicide à la thymidine tritiée) précisent encore la place et le rôle de la C.F.C.-A dans la granulopoïèse physiologique.

Nous ne ferons dans ce paragraphe qu'un rappel très simplifié de la lignée granuleuse ; le système monocytaire y sera adjoint puisque la C.F.C.-A semble être l'ancêtre commun aux deux lignées.

1.2.1. LA GRANULOPOIESE NORMALE

Aux polynucléaires circulants correspondent, comme à chaque catégorie de cellules sanguines, des cellules formatrices ; ces cellules depuis déjà longtemps ont été regroupées selon des critères morphologiques en une lignée ; la connaissance de cette lignée granulocytaire a progressé grâce aux techniques isotopiques. Mais l'absence d'un marqueur spécifique de cette lignée (comme le fer pour la lignée érythroblastique) rend difficile l'étude de la production granulocytaire.

Le siège normal de la granulopoïèse chez l'adulte est la moelle osseuse (moelle rouge des os plats et des épiphyses des os longs).

La lignée a été divisée en différents stades selon le degré de maturation, c'est-à-dire selon l'aspect de certains constituants qui caractérisent la différenciation de la cellule dans sa lignée. Ces stades sont des étapes de transition, états successifs d'une cellule qui évolue vers sa morphologie définitive et vers l'acquisition d'une spécialisation fonctionnelle. Comme il n'y a pas de discontinuité dans la fabrication des

cellules du sang, on trouve dans la moelle tous les stades cellulaires de la lignée. Le passage d'un stade à un autre se fait souvent par une division, ce qui entraîne une augmentation considérable du nombre des cellules terminales fabriquées (phénomène d'amplification).

Dans la population granuleuse plusieurs pools sont définis (figure 1) :

- Deux pools ne sont pas identifiables morphologiquement, mais seulement par des techniques fonctionnelles :

  . le pool des cellules souches commun aux trois lignées, granulocytaire, érythroblastique et mégacaryocytaire ; pool caractérisé par la technique des colonies spléniques de Till et McCulloch ;
  . le pool des cellules progénitrices spécifiques de la lignée granuleuse ; pool caractérisé par la technique de culture sur agar.

- Trois pools peuvent être reconnus par des techniques morphologiques :

  . le pool de prolifération,
  . le pool de maturation et de réserve,
  . le pool fonctionnel d'utilisation situé dans la circulation et les tissus.

1.2.1.1. Le pool des cellules souches hématopoïétiques

La cellule souche hématopoïétique est étudiée par la technique de transfusion de cellules médullaires normales isogéniques à des souris irradiées à dose léthale (177). Les souris ainsi transfusées survivent et dans leur rate apparaissent au 10ème jour des nodules hématopoïétiques en nombre proportionnel au nombre de cellules injectées ; ces nodules sont en fait des clones cellulaires dont l'origine est une cellule unique : elle est appelée C.F.C.-S ("Colony-Forming Cell in Spleen"). Elle correspond à la C.S.H. dont l'existence était supposée depuis longtemps. Ses

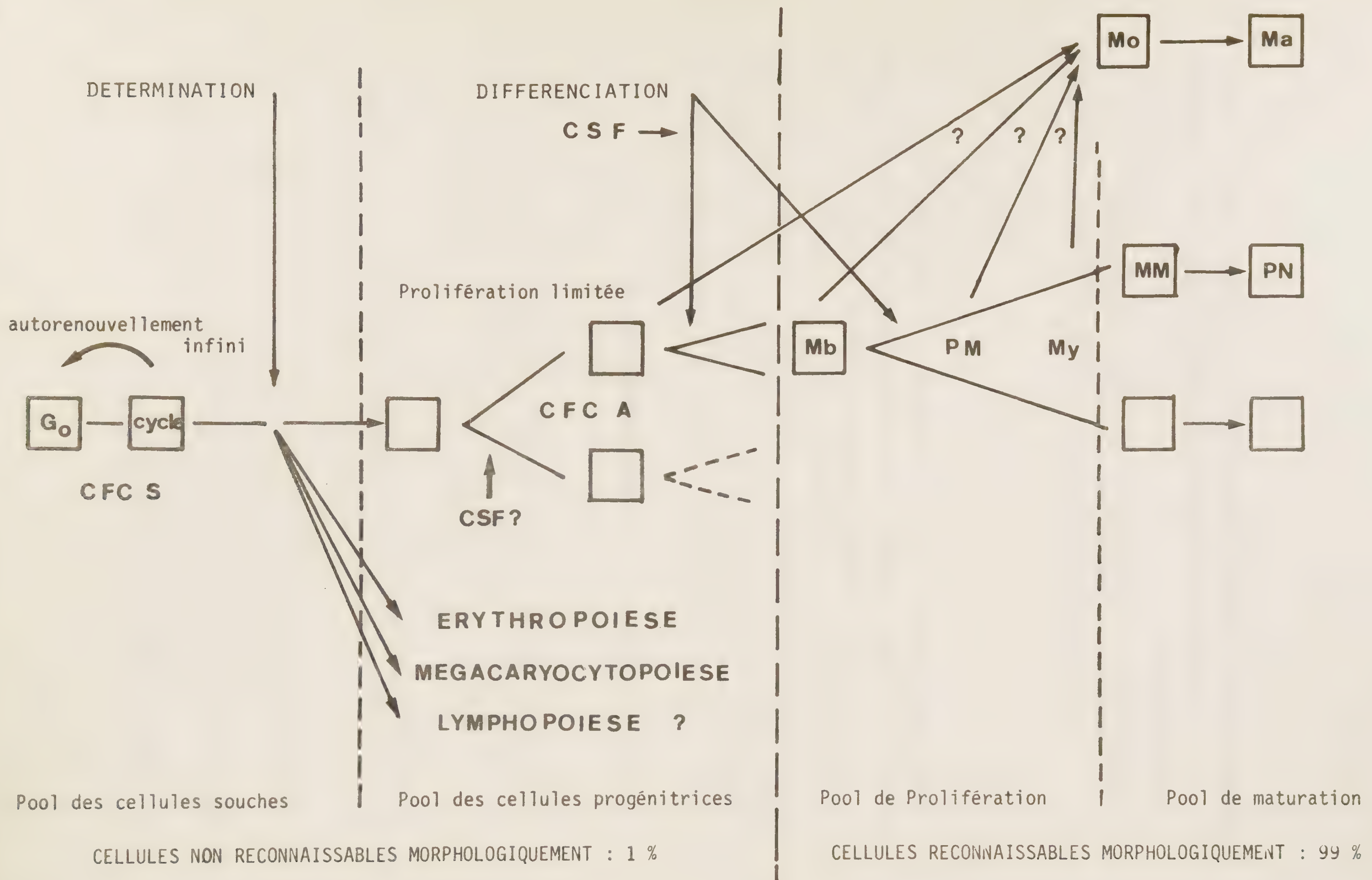


FIGURE 1 : SCHEMA DE LA GRANULOPOIESE

principaux caractères sont les suivants :

- elle est totipotentielle, c'est-à-dire qu'elle peut donner naissance à toutes les lignées hématopoïétiques ;

- elle est capable d'autorenouvellement et se maintient donc en nombre constant quelle que soit la demande périphérique (79) ;

- elle possède des caractères cinétiques particuliers : 90 à 95 % de ces cellules sont dans un état quiescent (période Go en dehors du cycle cellulaire) (80).

Une partie des cellules de ce pool s'engage dans la voie de la différenciation par un phénomène irréversible de spécialisation et constitue le pool des cellules progénitrices granulocytaires.

1.2.1.2. Le pool des cellules progénitrices

Il est étudié par la technique de culture sur agar. Les C.F.C.-A constituent vraisemblablement un pool de cellules prédifférenciées rapidement disponibles en cas de demande périphérique accrue ; ces cellules ont un pouvoir de prolifération limitée et jouent un rôle analogue aux cellules sensibles à l'érythropoïétine dans l'érythropoïèse.

Si l'on se réfère au modèle érythroblastique, le C.S.F. pourrait jouer le même rôle que l'érythropoïétine dans l'induction des cellules du pool précurseur vers leur maturation définitive (8).

1.2.1.3. Le pool de prolifération

Il est constitué par les cellules granuleuses les plus jeunes, morphologiquement reconnaissables et capables de se diviser.

Données cinétiques

Le pool prolifératif ou mitotique a été subdivisé en compartiments selon des critères morphologiques et cinétiques : myéloblastique,

promyélocytaire et myélocytaire. Sans entrer dans les détails, il faut préciser que pour Cronkite (44), le temps de passage dans ce pool est d'environ 140 heures ; il existe une division entre le myéloblaste et le promyélocyte et entre celui-ci et le myélocyte. Par contre, il existe 2 divisions au stade myélocytaire : une homomorphogénique donnant des myélocytes et une hétéromorphogénique donnant des métamyélocytes (figure 2a).

En réponse à une demande périphérique accrue, la production supplémentaire est assurée par le compartiment myélocytaire ; le temps de génération des myélocytes est raccourci ; si la durée de G1 passe de 37 à 21 heures, une nouvelle mitose apparaît et la taille de ce compartiment double ; si elle est de 9 heures, le nombre de myélocytes quadruple.

D'autres modèles ont été discutés (12) :
L'équipe d'Athens (1) accorde au compartiment myélocytaire 3 mitoses et explique les modifications de la production de la manière suivante : au stade myélocytaire existe un retour en arrière d'une partie des cellules (figure 2b), c'est-à-dire qu'un myélocyte en se divisant va donner un métamyélocyte et un myélocyte (division α-n d'Osgood) ; cela fait du compartiment myélocytaire un compartiment central qui se perpétue à demi et qui n'a pas besoin d'être alimenté par le compartiment d'amont ; en cas de demande accrue, ce phénomène est supprimé et la production réelle est augmentée. De ce fait, ce sont les compartiments d'amont qui assurent alors l'essentiel de la production.
Selon Patt et Maloney (88), un grand nombre de cellules meurent au niveau de ce compartiment (granulopoïèse inefficace) ; en cas de besoin, le rendement est amélioré par diminution de la mort cellulaire et la production réelle est augmentée ; cela n'a pas été prouvé chez l'homme.

Données cytologiques

Le processus de différenciation se caractérise par une diminution de la taille du noyau et du rapport nucléocytoplasmique, la disparition des nucléoles, la condensation de la chromatine et l'apparition dans le cytoplasme de granulations spécifiques. Trois stades morphologiques sont décrits :

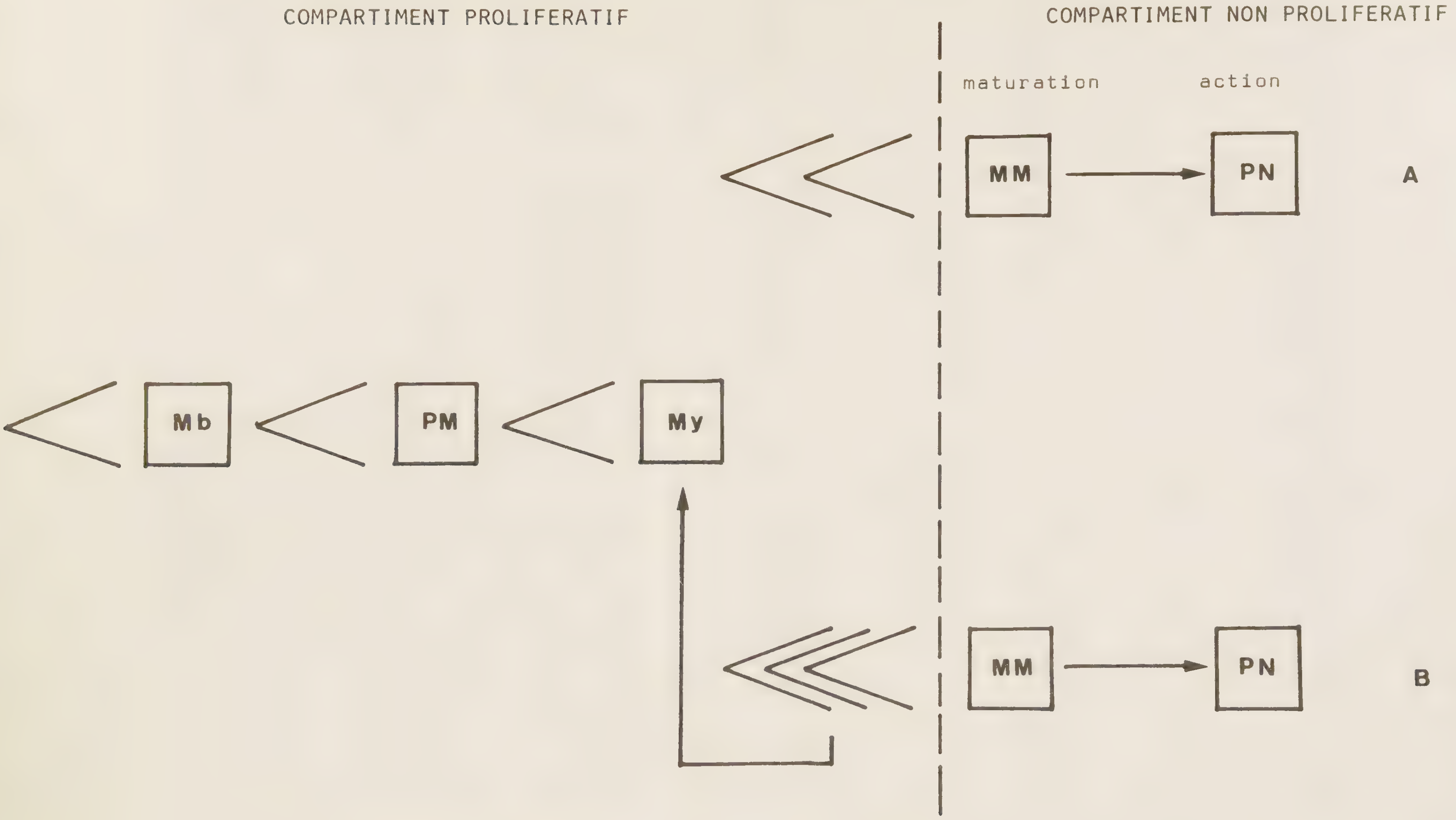


FIGURE 2 : MODELE DE LA GRANULOPOIESE : A) SELON CRONKITE (44)
B) SELON ATHENS (1)

- le myéloblaste, cellule de 25 µ de diamètre au noyau volumineux et à chromatine fine, possédant 2 à 5 nucléoles, et au cytoplasme basophile contenant de rares granulations azurophiles. La réaction des péroxydases est positive ;

- le promyélocyte, cellule de 20 µ dont la chromatine se condense par endroit, dont les nucléoles ne sont visibles qu'au microscope électronique et dont le cytoplasme, moins basophile, contient deux types de granulations : azurophiles non spécifiques et spécifiques (neutrophiles ou éosinophiles ou basophiles) ;

- le myélocyte, cellule de 15 µ dont le noyau présente des masses chromatiniennes nettes et le cytoplasme acidophile contient au microscope optique des granulations spécifiques, et des restes de granulations azurophiles visibles en microscopie électronique (9).

Données numériques

La lignée granulocytaire représente 22 à 85 % des éléments des frottis de moelle humaine normale et le compartiment prolifératif se répartit comme suit (190) :

Myéloblastes	0,3	à	5,0 %
Promyélocytes	1,0	à	8,0 %
Myélocytes	5,5	à	22,5 %

De façon plus précise, la taille du compartiment myélocytaire a été calculée par Cartwright (26) : 41.10^8 cellules par kg.

1.2.1.4. Le pool de maturation et de réserve

Données cinétiques

Les métamyélocytes, polynucléaires non segmentés et polynucléaires segmentés sont les étapes successives de cette maturation. Ces cel-

lules ne peuvent plus se diviser ; le flux cellulaire d'entrée est donc égal au flux de sortie.

Le temps de transit total à travers ce pool, c'est-à-dire le temps séparant l'entrée d'une cellule dans le compartiment des métamyélocytes de son passage dans le sang en tant que polynucléaire, a été calculé par certains auteurs : Cronkite l'estime à 152 heures (44).

Pour chaque compartiment, le temps de transit a été déterminé : 30,3 heures pour les métamyélocytes, 49,9 pour les polynucléaires non segmentés, 71,8 pour les segmentés.

En cas de demande accrue, le temps de transit se raccourcit et on assiste à l'apparition dans la circulation de granuleux non segmentés et de métamyélocytes.

Données morphologiques

Les cellules du pool de maturation sont assez semblables. Leur cytoplasme est légèrement acidophile, rempli de granulations spécifiques sur frottis colorés. Au microscope électronique existent encore des restes de granulations azurophiles.

Le noyau diffère :
- réniforme ou en bâtonnet incurvé, à chromatine dense, à mottes nettes, pour le métamyélocyte ;
- segmenté en 2 à 5 lobes réunis par un pont de chromatine, avec des masses chromatiniennes très denses pour le polynucléaire.

Données quantitatives

Sur un frottis de moelle humaine normale, on trouve :

13,0 à 32,0 % de métamyélocytes,
7,5 à 34,7 % de polynucléaires dont 7 à 30 % de neutrophiles.

La taille du compartiment métamyélocytaire est de 76.10^8 cellules/kg (26), celle du compartiment des polynucléaires neutrophiles de 69.10^8 cellules/kg (26). La production journalière de polynucléaires neu-

trophiles par la moelle est de 50 à 340.10^7/kg (44).

Il faut souligner que le volume du pool de maturation et de réserve est très nettement supérieur à celui du compartiment circulant (jusqu'à 10 fois plus grand), ce qui en fait un volant de régulation appréciable car il peut être mis en oeuvre très rapidement.

1.2.1.5. Le pool fonctionnel

Le compartiment sanguin

Une fois dans la circulation, les cellules granuleuses (polynucléaires ou granulocytes) se répartissent en deux populations : une circulante d'exploration aisée et une marginale étalée sur la paroi des vaisseaux ; il existe un échange constant entre ces deux populations qui sont à peu près de même taille ; certaines substances mobilisent brutalement la population marginale et augmentent la leucocytose apparente sans modifier en fait le volume total du compartiment sanguin.

Le temps de transit moyen, c'est-à-dire la durée moyenne de séjour des polynucléaires dans le sang, est de 6,6 heures pour Athens (2), 19 pour Dresch (50).

La taille du compartiment sanguin total est de 65.10^7 cellules/kg se répartissant en $31,7.10^7$ cellules/kg pour la population circulante et 33,3 pour la population marginale (2).

Dans le sang, la plupart des granulocytes disparaissent au hasard, indépendamment de leur âge, par diapédèse vers les tissus ; une faible proportion (5 o/oo) meurt par sénescence au bout de 30 heures après une période de picnose.

Le compartiment tissulaire

On ne connaît pas les caractéristiques de ce compartiment tissulaire ; son existence est d'ailleurs mise en doute.

Le destin des polynucléaires tissulaires est de mourir rapidement dans des infections infracliniques ou de migrer en dehors des tissus dans les diverses excrétions.

Il est important de noter que les différents pools ainsi définis ne migrent que dans un seul sens ; il n'existe pas à l'état normal de retour des cellules granuleuses des tissus vers le sang ou du sang vers la moelle.

1.2.2. LE SYSTEME PHAGOCYTAIRE MONONUCLEAIRE

La technique de culture sur agar a mis en évidence les rapports existant entre la lignée granuleuse et macrophagique. Ils seront discutés plus loin.

L'unicité du système, qui va être décrit brièvement ici, est avant tout fonctionnelle ; grande avidité phagocytaire et pinocytaire, capacité de se fixer solidement sur une surface de verre ; ce sont les propriétés essentielles des 3 catégories de cellules qui le constituent : promonocyte, monocyte et macrophage (181).

Le lieu de formation des monocytes (au moins d'une bonne partie d'entre eux) est la moelle osseuse (184) (134). Là se trouve la cellule souche reconnaissable cytologiquement, non identifiée *in vivo*, qui va alimenter le compartiment des promonocytes.

Le promonocyte, la plus immature des cellules reconnaissables de ce système, est donc une cellule médullaire ; de diamètre 14 à 20 µ, de rapport nucléocytoplasmique supérieur à 1, pourvu de nucléoles, cet élément peut se diviser : 50 à 70 % de ces cellules sont en phase S. Il donne naissance à 2 ou 3 monocytes (183) en un temps court : en effet, après marquage *in vivo* par la thymidine tritiée (3HTdR), les monocytes marqués apparaissent dans la circulation vers la 13e-26ème heure (189).

Les monocytes, cellules sanguines de 10 à 14 µ, de rapport nucléocytoplasmique voisin de 1, au noyau réniforme pourvu de nucléoles, ne se divisent pas. Ils constituent un groupe de cellules relativement immatures qui se rendent de leur lieu d'origine vers les tissus (observations chez l'homme par la technique de la fenêtre cutanée (180)).

Dans le sang, les monocytes s'équilibrent en 2 compartiments :

un marginal et un circulant (le rapport compartiment circulant sur compartiment marginal est voisin de 1/3,5) : marquage par le diisopropylfluorophosphate tritié (3HDFP) (118).

Le temps de séjour intravasculaire des monocytes est apprécié différemment selon les auteurs : le temps de demi disparition est de 8,4 heures pour Meuret (3HDFP) (118), 71 heures pour Whitelaw (3HTdR) (189). Par voie de conséquence, le taux de renouvellement varie lui aussi : 6.10^8 monocytes par heure pour le premier, $9,4.10^8$ par jour pour le second.

Dans les tissus, là où les conditions sont favorables à la phagocytose, les monocytes deviennent des macrophages et acquièrent l'équipement nécessaire pour digérer le matériel phagocyté.

Les macrophages tissulaires, fixés ou libres, sont des cellules de 10 à 25 µ, de rapport nucléocytoplasmique inférieur à 1, au noyau réniforme ou ovale pourvu de nucléoles. Un à trois pour cent de ces cellules sont en phase S. Leur cytoplasme est très riche en mitochondries, lysosomes et vésicules (181).

L'importance numérique des macrophages n'est pas connue avec précision, mais leur taux de formation doit être voisin du taux de renouvellement des monocytes ; en raison de leur longue durée de vie (75 jours ou plus d'après Florey (54)),leur nombre doit être considérable.

Nous ne retrouvons grâce à la technique de culture sur agar que les cellules extrêmes de ce système : la cellule souche et le macrophage.

1.3. APPLICATIONS A L'HOMME : LA LEUCEMOGENESE

La technique de culture sur agar a été très rapidement appliquée à l'homme.

Dès 1968, on a pu mettre en évidence l'existence du C.S.F. dans les liquides biologiques humains (sérum ou urine). En 1970, Chan et Metcalf

(30) décrivent la présence de substances inhibitrices dans le sérum de sujets normaux.

En 1970, Pike et Robinson (135) décrivent une technique d'étude de la C.F.C.-A en double couche (leucocytes normaux en sous-couche), qui donne des résultats homogènes et reproductibles chez l'homme.

Des modifications importantes du taux des substances régulatrices (C.S.F. et inhibiteurs) et de la formation de colonies à partir des cellules médullaires ont été observées dans les leucémies. Elles permettent d'apporter plusieurs éléments en faveur de certaines conceptions de la leucémogénèse.

1.3.1. GENERALITES

Les leucémies sont des maladies caractérisées par une prolifération excessive des cellules hématopoïétiques immatures qui franchissent leur barrière naturelle et envahissent le sang et d'autres organes. Leurs caractères cliniques les a fait considérer comme des maladies cancéreuses, néoplasiques répondant à la définition de Furth (59) : "La néoplasie est un état dans lequel les cellules, normalement limitées, prolifèrent sans frein". Cet état peut être la conséquence d'anomalies intrinsèques à la cellule, génétiquement déterminées, mais aussi celle d'un déséquilibre de la régulation humorale qui contrôle la croissance cellulaire.

Dans l'espèce humaine, l'existence d'une cellule souche, fonctionnant comme celle qui a été décrite chez la souris dans le chapître précédent, est très probable. Il s'agit au moins dans certains cas de la cellule cible du phénomène leucémique ; en effet, dans la leucémie myéloïde chronique, caractérisée on le sait par un chromosome anormal (128), on trouve cette marque dans les myéloblastes mais aussi les mégacaryocytes et les érythroblastes (178-188). De même dans certaines observations de leucémies aiguës, les mêmes anomalies chromosomiques ont été vues dans les myéloblastes, les érythroblastes (77) et les lymphocytes stimulés par la phytohémagglutinine (23).

1.3.2. THEORIES DE LA LEUCEMOGENESE

Pour la description des trois théories essentielles de la leucémogénèse, nous emprunterons beaucoup à la thèse de Brommer (23) et à la revue de Clarkson (41).

Théorie clonale

Elle a été élaborée par Killmann (76) sous le nom de "sleeper to feeder stem cell hypothesis" ; elle est schématisée dans la figure 3a.

Chaque individu naît avec une quantité déterminée de cellules souches ; ces cellules "dormantes" sont stimulées au hasard, une par une, pour constituer un clone de cellules hématopoïétiques. L'épuisement d'un clone est suivi de la formation d'un autre.
Killmann postule qu'une mutation leucémogène a atteint une ou plusieurs de ces cellules souches. La leucémie apparaît alors au hasard quand le clone issu de la cellule mutée se développe, et s'il n'est pas éliminé par les processus de défense de l'organisme.
Le traitement chimiothérapique détruit la plupart des cellules leucémiques mais respecte en partie les cellules souches qui vont repeupler la moelle ; la rémission s'installe si cette repopulation s'effectue à partir de cellules souches normales. Cependant, les cellules leucémiques restantes,elles aussi prolifèrent ; elles le font avec une cinétique différente de celle des cellules normales (temps de génération plus long, taux de production plus faible (75)),ce qui favorise le retour à l'hématopoïèse normale, mais n'empêche pas, qu'après un certain temps, la masse des cellules leucémiques est assez importante pour que la rechute clinique apparaisse.

Dans cette théorie existe donc en permanence un clone leucémique et un clone normal ; en période de rémission, le clone normal prédomine, en période de rechute c'est le clone leucémique, le clone normal étant inhibé pour des raisons encore obscures.

En faveur de cette première théorie on peut citer, outre les données des cultures *in vitro* que nous verrons plus loin :

- la disparition lors de la rémission d'anomalies chromosomiques présentes au début de la maladie et leur réapparition au cours de la rechute (67) ;

- les études isotopiques qui montrent que les cellules leucémiques et les cellules normales résiduelles ont une cinétique très différente (40).

Une preuve pourra être apportée si les nouveaux traitements intensifs et répétés (réinduction) augmentent le nombre de longue rémission ; ils auront alors détruit complètement le clone leucémique.

La deuxième théorie est celle qui fait intervenir des facteurs externes à la cellule.

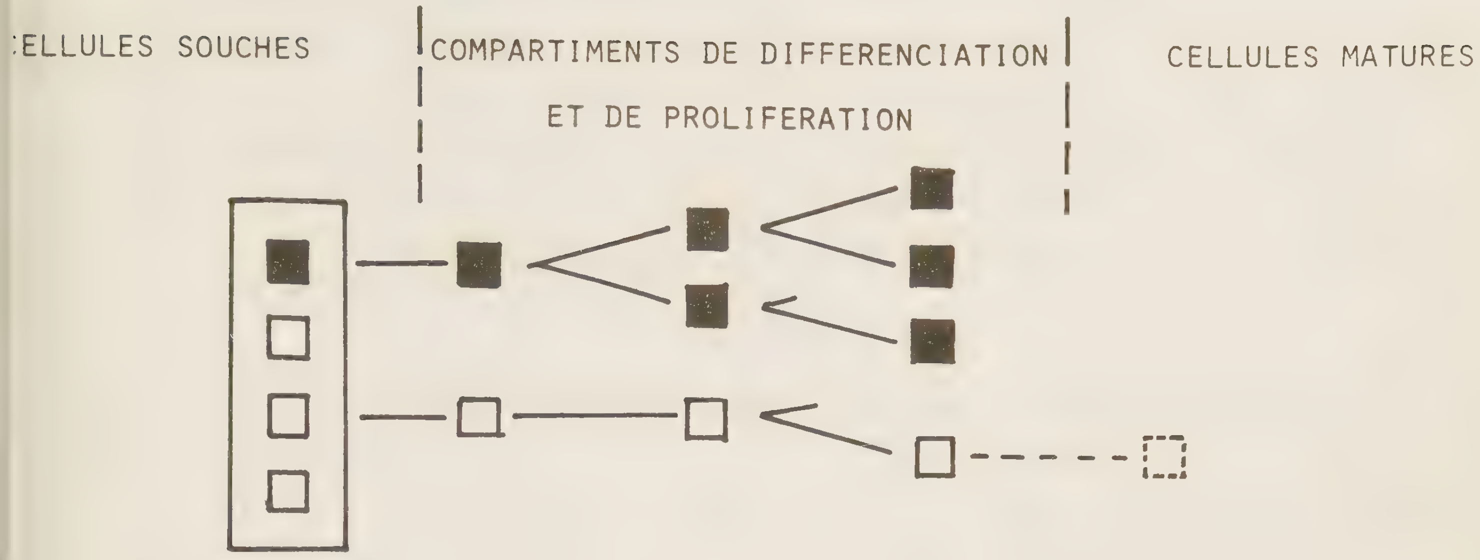
Il est supposé que les cellules souches restent normales mais que la transformation leucémique apparaît au moment du passage vers la cellule déterminée, progénitrice (figure 3b) ; cela implique la présence d'un agent de transformation.

Récemment un argument en faveur de cette théorie a été apporté par Fialkow (53) : une de ses malades, atteinte d'une leucémie aiguë, a subi une irradiation totale et une greffe de moelle provenant d'un donneur mâle ; 2 mois après la leucémie rechutait mais l'analyse chromosomique montrait que les leucoblastes portaient le chromosome Y ; les cellules du donneur, normales, ont été transformées par un agent présent chez l'hôte.

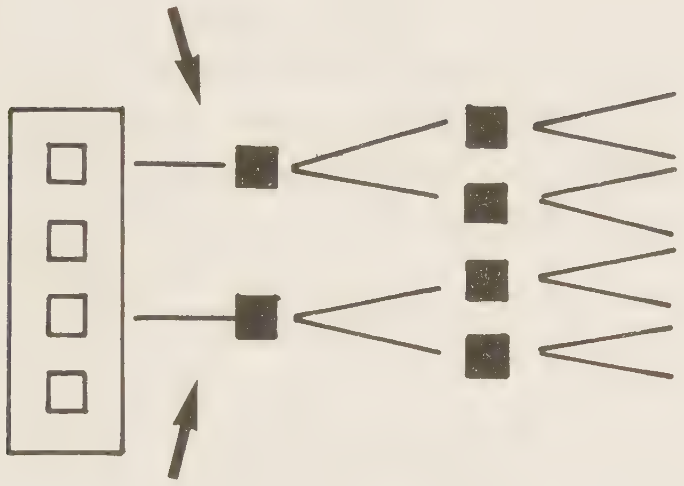
Parmi les autres arguments qui donnent du poids à cette hypothèse, il faut citer certaines études chromosomiques -en effet, dans de nombreux cas de leucémie aiguë les anomalies chromosomiques sont multiples, ce qui impliquerait l'existence de plusieurs clones leucémiques- et l'observation de rechute après de longues années de rémission (11) -le clone leucémique détruit en grande partie par le traitement devrait alors rester "dormant" très longtemps-.

Lorsqu'un agent externe agit sur une cellule pour la rendre leucémique, cette transformation ne se fait pas en une seule étape, mais passe par un stade où les cellules sont instables et sensibles à l'action de

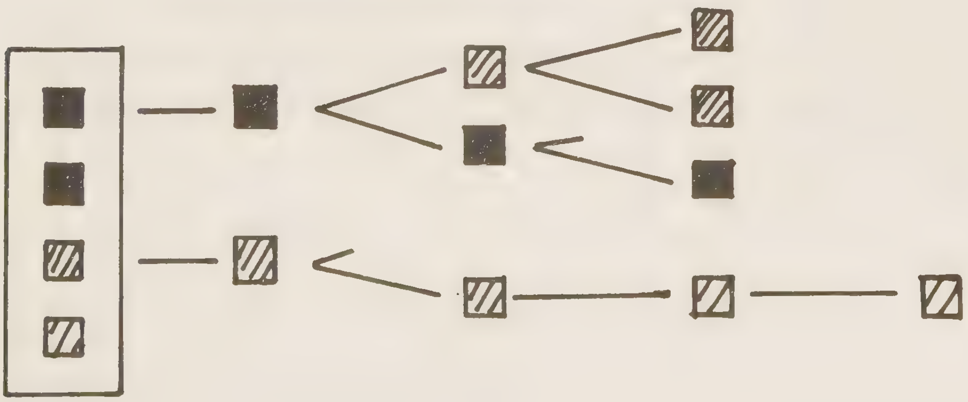
FIGURE 3 : DIFFERENTES THEORIES DE LA LEUCEMOGENESE D'APRES BROMMER (23)



a Théorie clonale



b Théorie de l'influence externe



c Théorie de la leucémie majeure et mineure

facteurs immunitaires ou régulateurs, qui peuvent empêcher leur prolifération (figure 4).

D'après Metcalf (99) le système inhibiteur-activateur indispensable au développement normal de la granulopoïèse, serait un élément essentiel de l'élimination des cellules leucémiques. Par contre, un déséquilibre par excès d'activateur ou défaut d'inhibiteur aboutirait à l'expansion du clone leucémique (figure 5).

La troisième hypothèse est celle de la leucémie mineure (76) (figure 3c).

On admet que la transformation leucémique n'est pas un phénomène de tout ou rien ; toutes les cellules souches sont leucémiques mais certains de leurs descendants paraissent normaux ; en effet, au cours des leucémies aiguës, les cellules mûres des différentes lignées sont porteuses de certaines anomalies : morphologiques (corps de Döhle, anomalie de Pelger pour les polynucléaires) et fonctionnelles (modification des groupes sanguins pour les érythrocytes) ; ils seraient les descendants de cellules leucémiques mineures tandis que les myéloblastes leucémiques appartiennent au clone "leucémique majeur" ; en rémission, le clone mineur prédomine.

Ces différentes théories n'ont pas qu'un intérêt spéculatif ; elles sont importantes en pratique pour la recherche thérapeutique : recherche de l'éradication totale du clone leucémique par une chimiothérapie de plus en plus agressive et sélective ; ou recherche d'une action sur les facteurs externes et en particulier les régulateurs pour obtenir le déblocage de la différenciation cellulaire ; dans l'avenir, la répression du facteur oncogène dans le génome de la cellule est le but ultime.

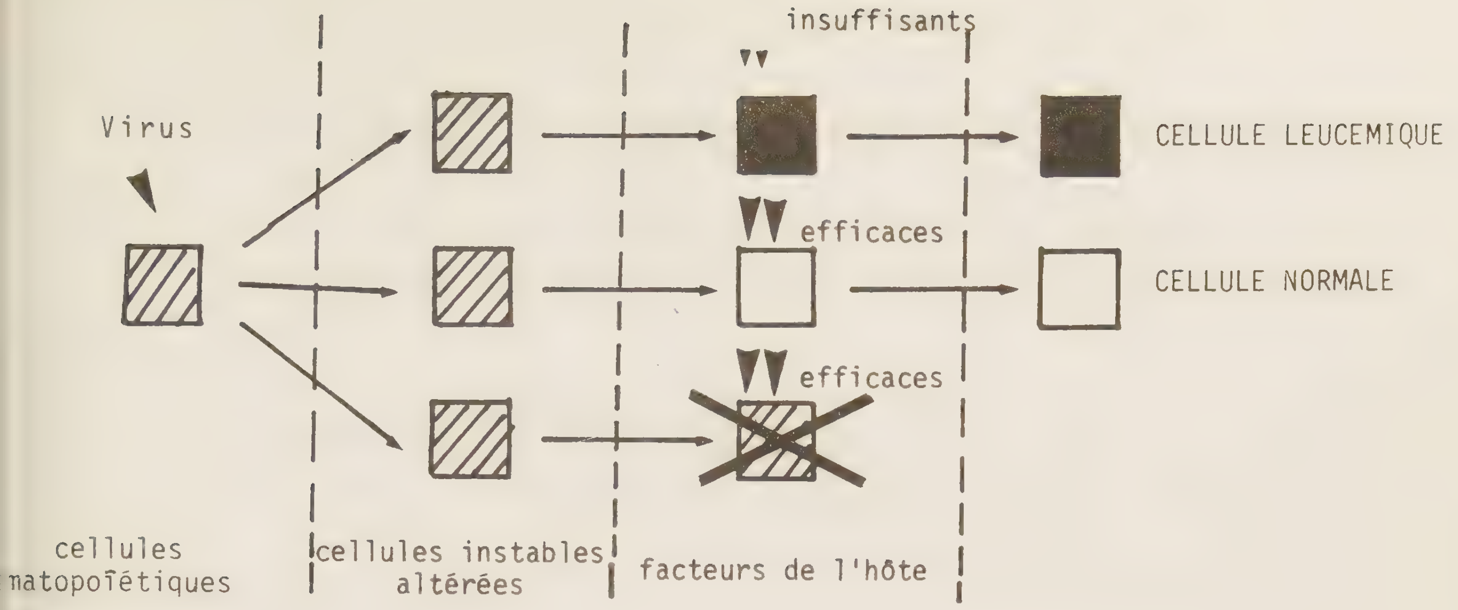


FIGURE 4 : SCHEMA MONTRANT LA NATURE PROGRESSIVE DU DEVELOPPEMENT DES LEUCEMIES ET LE ROLE DES FACTEURS DE L'HOTE

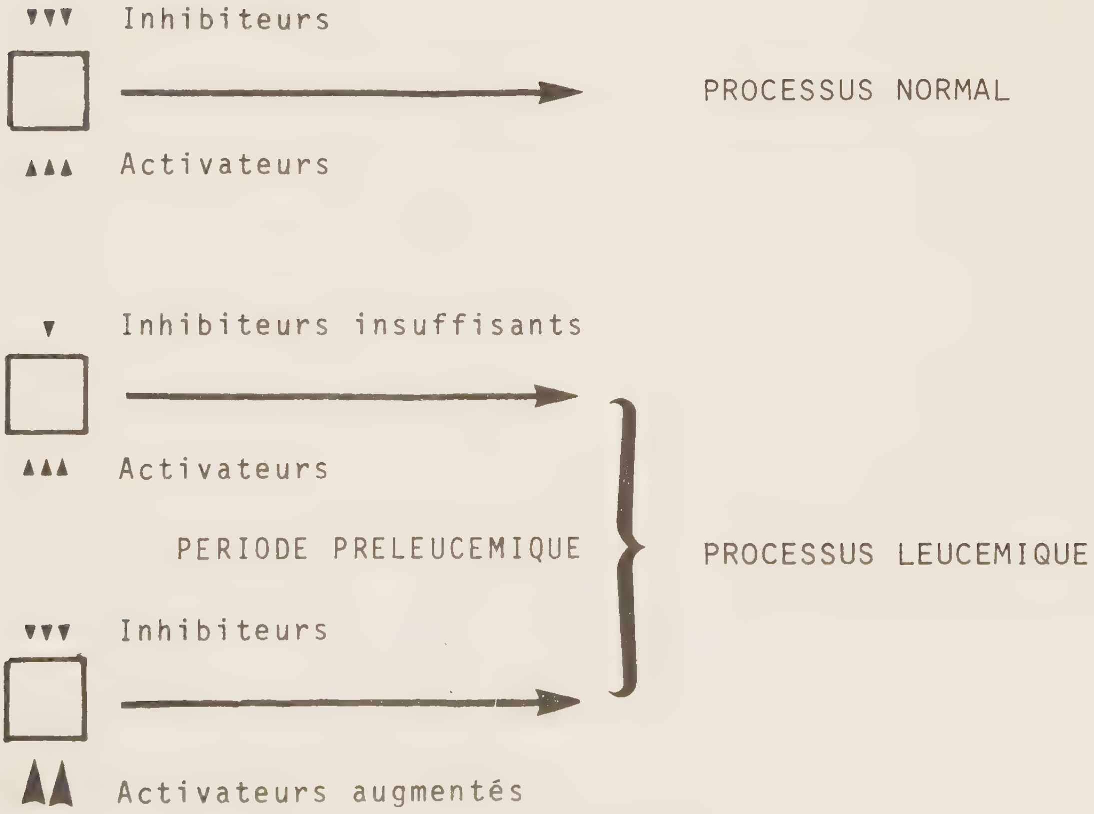


FIGURE 5 : SCHEMA MONTRANT L'EQUILIBRE ENTRE LES REGULATEURS DE LA CROISSANCE CELLULAIRE

1.3.3. INTERET DE LA CULTURE SUR AGAR DANS LES LEUCEMIES

Dans la connaissance de la leucémogénèse, la culture des cellules hématopoïétiques en gel d'agar a un triple intérêt. Elle permet en effet :

- le dosage de certaines substances, régulatrices de la granulopoïèse (le C.S.F. et les inhibiteurs du C.S.F.), et donc de préciser leur rôle dans l'apparition et le maintien du phénomène leucémique ;

- l'étude des troubles de la différenciation qui existent dans les leucémies aiguës (localisation, importance, évolution en fonction du traitement) ;

- enfin, elle autorise diverses hypothèses concernant la nature de la cellule leucémique et ses rapports avec la C.F.C.-A normale.

CHAPITRE 2

LES CELLULES FORMANT DES COLONIES EN AGAR (C.F.C.-A)

2.1. NATURE CLONALE DES COLONIES

2.2. PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION IN VITRO DE LA C.F.C.-A

2.3. NATURE ET MORPHOLOGIE DE LA C.F.C.-A

2.4. PROPRIETES DES C.F.C.-A

2.5. RELATIONS ENTRE C.F.C.-A ET C.F.C.-S

2.6. C.F.C.-A HUMAINE

La définition de cette cellule n'est, pour le moment, que fonctionnelle : il s'agit de l'unité cellulaire qui, *in vitro* dans des conditions de culture bien précises, prolifère, se différencie et forme un clone de cellules granuleuses et (ou) macrophagiques. La majeure partie des données rapportées ici ont été acquises par l'expérimentation chez la souris.

2.1. NATURE CLONALE DES COLONIES

Il a déjà été dit, que, lors de la culture en gel d'agar de cellules hématopoïétiques en présence d'un stimulant, apparaissent, après un certain temps d'incubation, des colonies ; celles-ci sont la conséquence d'une prolifération cellulaire et non d'un rassemblement ou d'une agrégation de cellules déjà existantes : en effet, dans l'agar, les cellules sont peu mobiles (104), l'ensemencement de cellules irradiées n'est suivi de l'apparition d'aucune colonie (136) et l'isolement, au 3ème jour d'incubation, d'un agrégat du reste des cellules par un cylindre de verre n'empêche pas la formation de colonie normale à l'intérieur (136).

Par analogie avec la technique de Till et McCulloch, il a paru vraisemblable qu'elles soient de nature clonale, c'est-à-dire issues d'une seule cellule.

Il n'existe pas encore de preuve formelle de cette hypothèse, mais de nombreuses observations sont en sa faveur :

- le fait que le nombre de colonies soit proportionnel au nombre total de cellules ensemencées (16-71-136) (figure 1) ;

- Paran (132) ensemence une suspension cellulaire dans les conditions habituelles ; il détermine de façon très précise la localisation d'une cellule isolée ; à sa place apparaît plus tard une colonie ; il en

déduit la filiation : cellule unique-colonie ;

- Moore (121) met en culture des cellules isolées (1 à 25 par boîte) provenant d'une fraction enrichie en C.F.C.-A par une méthode de séparation des cellules médullaires selon leur densité ; après 8 jours d'incubation 85 % d'entre elles ont proliféré et donnent des colonies de 50 à 450 cellules granuleuses et (ou) macrophagiques ;

- enfin, chez l'homme un fait intéressant a été rapporté par Chervenick (38) ; cet auteur cultive en agar des cellules médullaires provenant de malades atteints de leucémie myéloïde chronique. Parmi les colonies qui se développent *in vitro*, certaines portent le chromosome Philadelphie, d'autres non ; mais dans les colonies positives pour le Ph1, toutes les métaphases examinées le sont et inversement pour les colonies négatives ; il n'y a jamais, dans une même colonie, des cellules portant le chromosome anormal et des cellules de caryotype normal.

Ainsi, il est hautement probable que chaque colonie développée *in vitro* dérive d'une seule cellule, nommée cellule formant des colonies en agar : C.F.C.-A. Le nombre de clones est proportionnel au nombre de ces cellules dans la suspension cellulaire ; leur mise en évidence est donc possible par la technique de culture en gel d'agar.

2.2. PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION IN VITRO DE LA C.F.C.-A

Cultivée en gel d'agar, en présence de C.S.F., la C.F.C.-A prolifère et donne naissance à des cellules filles morphologiquement reconnaissables.

La multiplication n'est pas immédiate : un temps de latence est observé avant le début de la prolifération ; il est de 12 heures au minimum pour Metcalf (93) (calcul par extrapolation à 0 de la courbe faite en fonction du temps, du nombre d'agrégats apparus lors de la culture de 25 000 cellules médullaires de souris stimulées par une quantité optimale d'urine humaine active).

Cette prolifération va aboutir à la formation d'agrégats et de colonies.

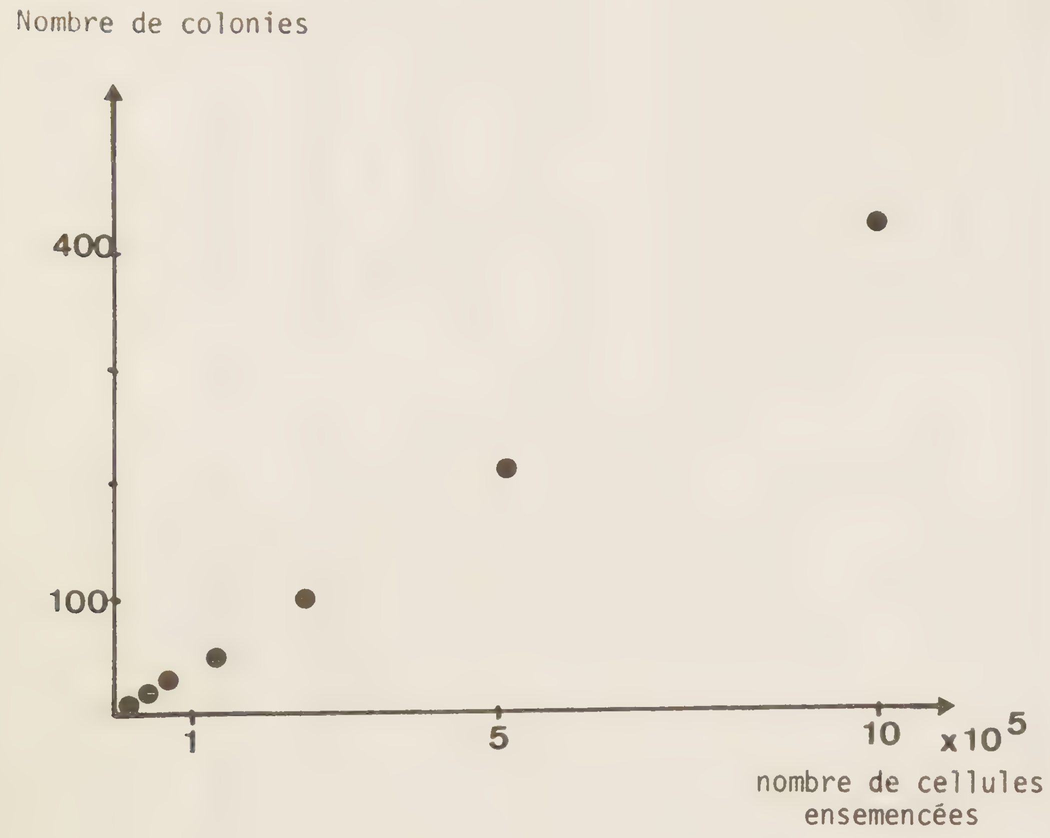


FIGURE 1 : RELATION ENTRE LE NOMBRE DE CELLULES ENSEMENCEES ET LE NOMBRE DE COLONIES DEVELOPPEES AU 14ème JOUR

(d'après Bradley (16))

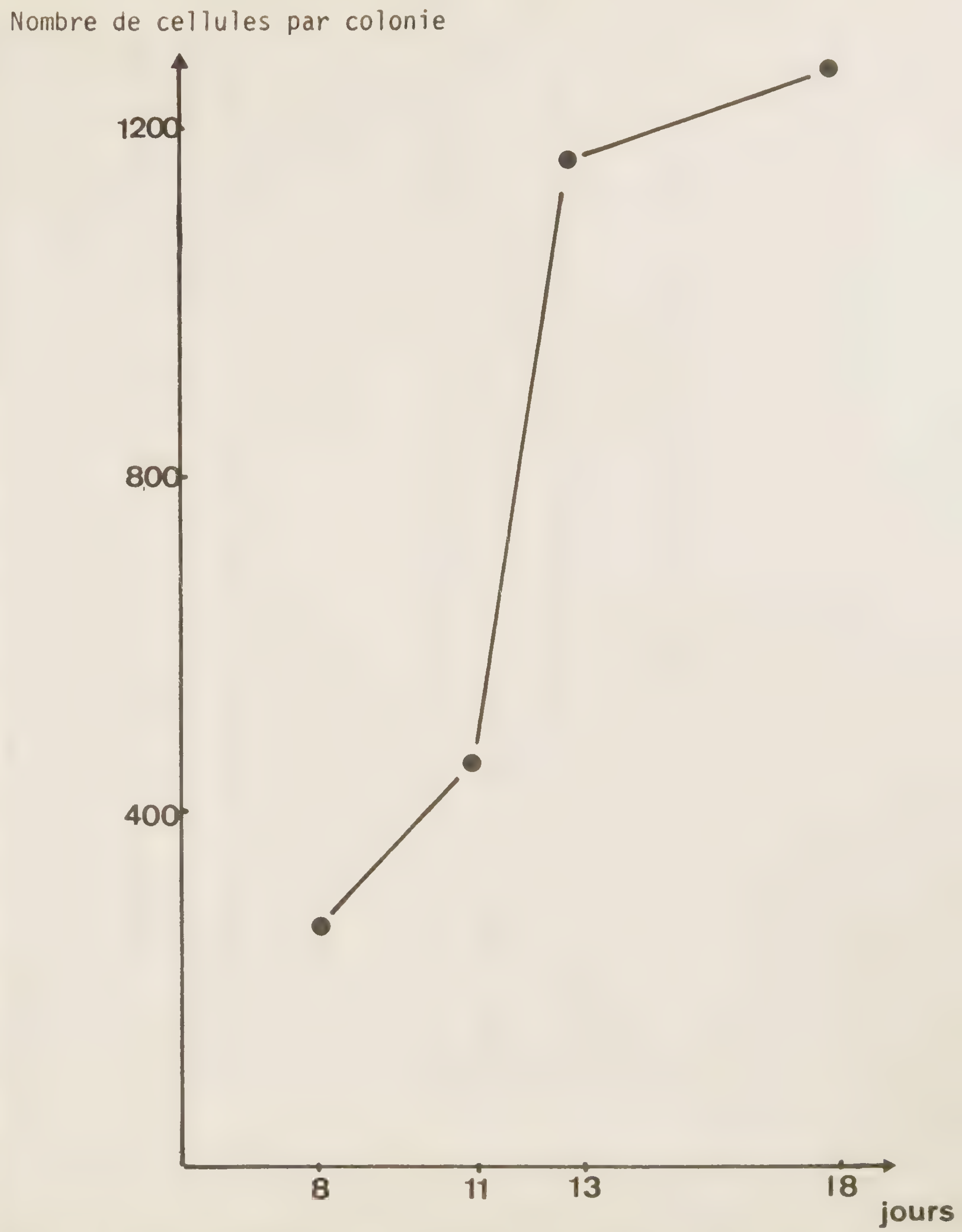


FIGURE 2 : NOMBRE DE CELLULES PAR COLONIE SELON LA DUREE DE L'INCUBATION (d'après Pike (135))

2.2.1. NOMBRE ET TAILLE DES CLONES CELLULAIRES

Pour une même stimulation, le nombre de colonies dépend du nombre de C.F.C.-A mises en culture, donc du nombre total de cellules ensemencées. Il est en moyenne de 200 pour 2.10^5 cellules médullaires de souris (16) (lecture au 14ème jour - stimulation par 2.10^6 cellules rénales murines en couche nutritive), de 33 pour 10^6 cellules spléniques de souris (136) (lecture au 10ème jour - stimulation par 10^5 cellules embryonnaires de souris en couche nutritive).

La taille, appréciée par le nombre de cellules qui composent une colonie, est variable selon l'origine des cellules cultivées (souris, singe...), selon l'intensité de la stimulation, selon la durée de l'incubation (figure 2). Dans une même culture, à un moment donné, l'hétérogénéité de taille des clones traduit en partie l'absence de synchronisme de leur origine : certaines cellules commencent leur prolifération dès le premier jour, d'autres plus tard, jusqu'au 5ème ou 6ème jour (93).

L'augmentation de taille et de nombre vont en général de pair (19) : l'augmentation du nombre de cellules ensemencées se traduit par une augmentation du nombre de colonies mais aussi de la taille de ces colonies. Cet effet semble dû à l'apport de facteurs stimulants efficaces à courte distance : substances élaborées par les cellules ou produites par la dégradation des autres cellules. Après un certain temps d'incubation (8 jours pour les cellules de souris, 18 pour celles de l'homme), la prolifération cellulaire s'arrête, toutes les cellules étant matures. La taille des clones est alors maximale ; plus tard, en raison de la mort cellulaire, elle diminuera.

2.2.2. ASPECT MORPHOLOGIQUE ET COMPOSITION CELLULAIRE DES CLONES ISSUS DES C.F.C.-A

2.2.2.1. Trois types morphologiques de colonies peuvent être décrits (16-93-104-136) :

- des colonies compactes, denses, qui poussent à la surface et

dans l'épaisseur de l'agar,

- des colonies lâches, en une couche de cellules proliférant à la surface de l'agar,

- des colonies intermédiaires à centre dense et halo clair, aux limites parfois peu nettes.

Pour certains auteurs, il existe une relation entre l'aspect et la composition cellulaire (71-110) : les colonies denses sont granuleuses, les lâches macrophagiques, les troisièmes mixtes (macrophagiques et granuleuses). Mais cette règle n'est pas toujours respectée et certains types de stimulant favorisent un aspect particulier (l'urine humaine purifiée induit la formation de colonies lâches bien que granuleuses).

2.2.2.2. Composition cellulaire

Deux types de cellules peuvent être mis en évidence dans les colonies : des cellules granuleuses et des cellules macrophagiques. A l'exception des cultures de cellules de foie foetal (171) il n'a jamais été possible de trouver des cellules lymphoïdes ni d'éléments de la lignée érythroïde (même si de l'érythropoïétine est ajoutée à la culture (110) ou si des cellules médullaires de souris atteintes d'érythroleucémie induites par le virus de Friend sont cultivées (18)). Un auteur a décrit de petites colonies (3 à 10 éléments) de grandes cellules d'apparence mégacaryocytaire (125). Les mastocytes décrits par Pluznick en 1965 (136) se sont avérés être en fait des macrophages (71) : les granules métachromatiques visibles dans ces cellules et qui prêtaient à confusion étaient en réalité des particules d'agar phagocytés.

Les cellules granuleuses sont neutrophiles ; des granulocytes éosinophiles ont été décrits, l'utilisation de méthylcellulose à la place d'agar en favorise la pousse, mais ils sont le plus souvent isolés, rarement groupés en colonies.

L'évolution cytologique des colonies dans le temps a pu être précisée : toutes les colonies sont d'abord granuleuses puis macrophagiques, quels que soient le système de culture utilisé et l'espèce ; seul le moment de cette transition varie ; il dépend des conditions techniques (14).

Examinés précocément pendant les 24 premières heures, la plupart des amas sont composés de population pure de cellules granuleuses. Le deuxième jour, des macrophages commencent à apparaître ; le lendemain quelques agrégats sont purement macrophagiques et les colonies en majorité granuleuses contiennent aussi des macrophages. Le nombre de ces dernières cellules augmente progressivement ; au 8ème jour, la majorité des cellules sont des cellules mononucléées macrophagiques. La plupart des colonies sont constituées d'une population pure de macrophages.

Ainsi, trois phases évolutives peuvent être distinguées : phase de cellules exclusivement granuleuses, phase mixte, phase à prédominance macrophagique mais où quelques granulocytes en picnose persistent.

Si ces trois phases sont constamment retrouvées, leur chronologie varie avec le stimulant utilisé (dans l'exemple décrit ci-dessus, le C.S.F. provenait d'urine humaine et les cellules cibles étaient des cellules médullaires de souris).

L'identité des cellules a été formellement définie par des techniques microscopiques. En ce qui concerne la moelle de souris, la majorité des cellules présentes dans l'agar sont viables jusqu'au 10ème jour.

Pour la lignée granuleuse, l'identification a été permise par des études au microscope optique après coloration à l'orcéine et au May-Grünwald-Giemsa. Au microscope électronique, on a mis en évidence des granules neutrophiles typiques (110). Toutes les cellules de cette lignée sont présentes dans les cultures : durant les 24 premières heures, les agrégats sont surtout composés de myéloblastes ; puis le 2ème jour, apparaissent des myélocytes et des métamyélocytes. Parfois les colonies au 5ème jour peuvent montrer un haut degré d'uniformité dans la différenciation : toutes les cellules d'une colonie sont des myéloblastes ou des mé-

tamyélocytes ; mais cela est rare et en général, la colonie contient une population mélangée de cellules, certaines restant primitives et ayant une activité mitotique élevée, les autres se différenciant en cellules incapables de se diviser.
Quand la durée de l'incubation augmente, la composition cellulaire se modifie au profit des cellules les plus matures et l'activité mitotique décroît. Après le 10ème jour, il n'y a plus de mitose.
En fait, souvent la différenciation cesse au stade de métamyélocytes ou de polynucléaires non segmentés. Quand le stade du polynucléaire est atteint, ces cellules ont une capacité de survie assez brève en culture (2 à 3 jours) et ensuite se désintègrent.

La lignée macrophagique se compose de deux sortes de cellules :

- des grandes cellules, au noyau rond, volumineux, de 8 à 20 µ de diamètre, à chromatine fine, douées d'une activité mitotique importante (104) ;

- des cellules plus petites, au noyau excentré, de 5 à 8 µ de diamètre, au cytoplasme rempli de vacuoles ; elles ne se divisent plus.

En fait, ces deux catégories ne sont pas très précisément individualisées, tous les intermédiaires existent ; il faut retenir que, au fur et à mesure de la maturation des colonies, les cellules non granuleuses perdent leur capacité proliférative ; en même temps leur noyau diminue de taille et devient plus excentré.

Ces cellules ont été reconnues comme étant des macrophages, d'abord par leur morphologie au microscope optique et leur capacité de phagocyter des particules de carbone (103). L'observation en microscope électronique confirme cette identité (104).

Cline (42) trouve que 90 % des cellules des colonies âgées de 8 à 10 jours adhèrent au verre, phagocytent des bactéries et des levures. En contraste de phase et par leur coloration péroxydase négative, ces cellules ne peuvent être distinguées des macrophages péritonéaux. En outre, 85 à 100 % de ces cellules présentent des sites récepteurs pour les immunoglobulines G comme les macrophages péritonéaux et les monocytes. Avant le 5ème jour, peu de cellules possèdent ces sites.

Rapports des cellules granuleuses et des macrophages : la nature clonale des colonies implique que toutes les cellules dérivent d'un même ancêtre et que les cellules granuleuses peuvent se transformer en macrophages. Cette transformation, évoquée par Bradley (21), a été confirmée par une cartographie précise des agrégats, des expériences de transplantation et l'existence de cellules de morphologie intermédiaire (91-93-97-107).

Il est ainsi permis de supposer qu'*in vitro* existe la filiation cellule granuleuse-macrophage ; elle s'effectue à partir de tous les stades de maturation, mais surtout du myélocyte. Son existence *in vivo* n'est pas formellement démontrée, mais l'existence des leucémies myélomonocytaires est en sa faveur ; chez la souris, Warner (186) montre que les cellules myéloïdes et monocytaires appartiennent au même clone leucémique.

Ainsi, en gel d'agar, la C.F.C.-A prolifère et se différencie d'abord en cellules granuleuses, puis en macrophages vrais.

2.3. NATURE ET MORPHOLOGIE DE LA C.F.C.-A

2.3.1. NATURE

Les résultats, que nous avons déjà rapportés, des cultures *in vitro* permettent de penser que la C.F.C.-A est la cellule ancestrale des lignées granuleuse et macrophagique (au moins en partie pour cette dernière).

In vivo d'autres faits sont en faveur de cette hypothèse : après irradiation, au moment de la période de neutropénie périphérique, apparaît dans la moelle une vague de C.F.C.-A suivie d'une augmentation du nombre des myéloblastes et promyélocytes ; il existe une relation linéaire entre le nombre de C.F.C.-A et le logarithme du chiffre de granulocytes (172). Les souris rendues polyglobuliques ont un nombre de C.F.C.-A médullaires supérieur à la normale ; au contraire, il est très inférieur chez les souris anémiques (19). De ce fait, la C.F.C.-A ne semble pas être un précurseur de la lignée érythroïde.

2.3.2. MORPHOLOGIE

Sa morphologie n'est pas définie ; il est probable qu'elle se présente sous différents aspects selon son degré de différenciation.

Pour Metcalf, il s'agit d'une cellule de grande taille, d'aspect blastique (110), pour Moore, cité par Stohlman (173) d'une grande cellule mononucléaire au cytoplasme basophile d'aspect lymphocytaire, comme la C.S.H. (cellule transitionnelle de Yoffey (193)) ; mais des preuves contre l'aspect lymphocytaire de la C.F.C.-A ont été apportées (4).

Tant qu'une suspension parfaitement pure de ces cellules n'aura pas été obtenue, aucune certitude ne pourra être acquise.

2.4. PROPRIETES DES C.F.C.-A

2.4.1. FREQUENCE

La fréquence des C.F.C.-A dans les différents organes hématopoïétiques est difficile à établir de façon précise en raison de la méconnaissance, dans une suspension cellulaire, du nombre de C.F.C.-A qui "clonent" en agar effectivement, par rapport au nombre de ces cellules qui ont la possibilité de le faire ("efficacité d'ensemencement") et de la dépendance très grande vis à vis des conditions de culture. Si la technique de culture en gel d'agar permettait de détecter toutes les C.F.C.-A (efficacité d'ensemencement de 100 %), la fréquence chez la souris de ces cellules dans la moelle serait de 1 pour 500 à 1 000 cellules nucléées, dans la rate 1 à 2 pour 10^5 cellules, dans le sang 2 pour 10^6 cellules nucléées.

2.4.2. CYCLE CELLULAIRE

L'effet de substances actives en phase de synthèse de l'ADN du cycle cellulaire (hydroxyurée ou thymidine tritiée à haute activité

spécifique) permet de dire que 45 à 60 % des C.F.C.-A passent par la phase S et sont donc en phase de prolifération active (81-82-74-100-141).

En raison de la période de latence qui sépare la mise en culture du début de la prolifération en agar, on peut penser que le temps de génération des C.F.C.-A est d'au moins 12 heures.

2.4.3. ACTION DE DIVERSES SUBSTANCES

L'irradiation entraîne une diminution du nombre de C.F.C.-A qui sont très radiosensibles (la D_{37} est estimée à 85 rads (143)) ; la cortisone a un effet analogue (110) et *in vitro* inhibe la formation de clones comme la L asparaginase (65).

Enfin, un certain nombre d'antigènes et en particulier l'endotoxine augmentent le nombre de C.F.C.-A. La transplantation de certaines tumeurs chez la souris provoque également ce même phénomène (69).

2.4.4. HETEROGENEITE DES C.F.C.-A

Dans une même culture, à un moment déterminé, nous l'avons dit, la taille des colonies n'est pas uniforme ; comme le stimulant est réparti à peu près régulièrement, les différences de taille correspondent à des variations de la capacité proliférante des C.F.C.-A : celles qui donnent les plus grosses colonies sont probablement les moins différenciées (les plus proches de la cellule souche).

Certaines propriétés physiques des C.F.C.-A ont pu être déterminées : 2/3 d'entre elles adhèrent au verre (110), la plupart ont une densité comprise entre 1,068 et 1,071 (68).

Les différentes techniques de séparation cellulaire -basées sur l'adhérence au verre, le volume, la densité- confirment l'hétérogénéité de cette population cellulaire, qui est retrouvée dans des fractions différentes. Les C.F.C.-A n'ont pas toutes la même réactivité vis à vis du C.S.F. ; par séparation des cellules médullaires en fonction

de leur densité, on peut obtenir 2 populations de C.F.C.-A : l'une est stimulée de façon identique par le C.S.F. sérique ou urinaire, l'autre, plus légère, est plus sensible au C.S.F. sérique.

Enfin, certaines C.F.C.-A donnent plutôt des colonies granuleuses pures tandis que d'autres en donnent des mixtes.

La propriété fonctionnelle de "cloner" en agar recouvre donc une population cellulaire hétérogène par son pouvoir de prolifération, ses propriétés physiques, son seuil de sensibilité au stimulant.

Il faut mentionner ici l'existence de cellules qui forment *in vitro* des agrégats cellulaires de 3 à 50 cellules : les "cluster forming cells". Ces cellules sont 10 fois plus nombreuses que les C.F.C.-A ; ce sont leurs descendants immédiats, probablement les myéloblastes et promyélocytes (110).

2.4.5. CAPACITE D'AUTORENOUVELLEMENT DES C.F.C.-A

Elle n'existe pas *in vivo* comme *in vitro*. Mais la grande taille des colonies oblige à admettre une certaine prolifération, limitée (10 à 20 cycles cellulaires peut-être), à l'intérieur du pool des cellules précurseurs : à partir d'une C.F.C.-A primitive dérivant de la C.S.H., vont se former d'autres C.F.C.-A, peut-être un peu plus différenciées, mais qui ont toujours la capacité de former des clones *in vitro*. Une certaine amplification existe à ce niveau, complétée par celle du pool prolifératif.

Testa (176) a montré que les colonies qui prolifèrent *in vitro*, contiennent après 24 heures d'incubation un nombre accru de C.F.C.-A ; il est multiplié par 4 ou 5 le 4ème jour et diminue ensuite ; cette augmentation n'est pas due au recrutement à partir de la C.S.H. car le même phénomène existe chez la souris W/Wv* où cette cellule est déficiente. Il s'agit d'une multiplication des C.F.C.-A.

2.5. RELATIONS ENTRE C.F.C.-A ET C.F.C.-S

La plupart des auteurs admettent que les cellules qui "clonent" en agar sont des précurseurs granuleux doués d'un pouvoir de prolifération limité et donc des éléments différents des cellules souches hématopoïétiques ; d'autres penchent pour l'identité de ces 2 types cellulaires : la cellule formant des colonies spléniques pourrait aussi proliférer et se différencier *in vitro*.

Sans entrer dans les détails, nous donnerons quelques éléments supportant l'une et l'autre théories.

- Les C.F.C.-A et les C.F.C.-S sont localisées dans les mêmes organes et il existe une relation linéaire entre les fréquences de ces 2 types cellulaires dans les colonies spléniques. Mais compte-tenu de l'efficacité d'ensemencement, ces clones contiennent beaucoup plus de C.F.C.-A que de C.F.C.-S.

- Etudiées par différentes techniques de séparation cellulaire, les C.F.C.-A et les C.F.C.-S montrent des propriétés physiques différentes : après passage d'une suspension cellulaire sur une colonne de billes de verre, Metcalf récupère 82 % des C.F.C.-S et 66 % des C.F.C.-A (111). En gradient de sérum albumine bovine, les C.F.C.-S et les C.F.C.-A se répartissent dans des régions de densité variable ; les fractions contiennent en général l'une et l'autre de ces cellules mais les profils de séparation sont différents (68). La densité est de 1,063 pour la plupart des C.F.C.-S, 1,069 pour les C.F.C.-A.
Worton, enfin, montre que leur vitesse de sédimentation n'est pas identique (191).

- Les C.F.C.-S sont en phase Go, hors du cycle cellulaire, pour la plupart : la thymidine tritiée à haute activité ne diminue leur nombre que de 10 % (6). Au contraire, un grand nombre de C.F.C.-A sont en phase proliférative.

- Les souris W/Wv sont génétiquement anémiques : leurs suspensions médullaires n'induisent pas la formation de colonies spléniques mais

celle de colonies *in vitro* (7).

A ces faits qui tendent à prouver l'existence de 2 types cellulaires bien distincts, Dicke en oppose d'autres (47-48-49).

- Dans les fractions de moelle séparées en gradient discontinu d'albumine, le rapport C.F.C.-S sur C.F.C.-A est constant ; ce qui revient à dire qu'on ne peut pas séparer ces 2 cellules par cette technique ;

- la vitesse de sédimentation ne le permet pas non plus (contrairement aux données de Worton exposées plus haut) ;

- les deux populations (C.F.C.-S et C.F.C.-A) sont également sensibles à la thymidine tritiée ; après incubation en sa présence, 85 % des C.F.C.-A et 82 % des C.F.C.-S peuvent être récupérés.

- Enfin, cet auteur met en culture des fractions de suspensions médullaires de souris traitées à la vinblastine et réinjecte les colonies apparues *in vitro* à des souris irradiées ; les colonies spléniques formées sont érythroblastiques, granuleuses ou mégacaryocytaires. Il met ainsi en évidence dans les colonies en agar l'existence d'un certain nombre de C.F.C.-S ; or leur nombre, après 4 jours de culture, est supérieur au nombre de C.F.C.-S ensemencées. Il y a donc eu, *in vitro*, autoreplication ou multiplication des C.F.C.-S.

Il est difficile devant ces expériences contradictoires de conclure formellement à l'identité des C.F.C.-A et des C.F.C.-S ou à l'existence de 2 populations différentes. Il s'agit vraisemblablement d'un problème de technique de culture : celle de Dicke permettrait la prolifération et la différenciation des C.S.H. *in vitro*.

Cependant, pour la plupart des auteurs, la C.F.C.-A est considérée comme une cellule progénitrice de la lignée granuleuse ("granulopoietic committed stem cell"), descendante immédiate de la C.S.H. (192).

2.6. C.F.C.-A HUMAINE

Le problème des relations entre C.F.C.-A et C.F.C.-S est très important en ce qui concerne l'hématopoïèse humaine, puisqu'il n'existe actuellement aucune technique permettant de caractériser la C.S.H. humaine.

Par contre, il est possible de mettre en évidence, par la technique de Pike et Robinson (135), l'existence de C.F.C.-A dans la moelle (148) et dans le sang (37-78-85) humains normaux : 30 à 100 colonies (moyenne = 50) de 50 à 1 500 cellules sont obtenues à partir de 2.10^5 cellules médullaires ensemencées ; 0 à 5 à partir de 2.10^5 cellules nucléées sanguines.

CHAPITRE 3

REGULATEURS DE LA GRANULOPOIESE

3.1. FACTEUR STIMULANT LES COLONIES (C.S.F.)

3.2. INHIBITEURS

Dans l'organisme le taux des différents éléments cellulaires du sang (cellules matures à vie courte) est à un niveau constant ; cela implique une production strictement réglée, qui compense la destruction permanente.

La régulation du système hématopoïétique se fait grâce aux mécanismes de contrôle des transitions cellulaires qui s'effectuent constamment ; ces transitions sont soit réversibles, par exemple la mise en cycle cellulaire de la C.S.H. précédemment en Go ; soit irréversible dans le cas d'une transition comportant une étape de différenciation : passage de la C.S.H. à la cellule prédifférenciée puis aux cellules reconnaissables.

La régulation des C.S.H. se fait vraisemblablement grâce à des facteurs génétiques et à des stimuli externes à court rayon d'action, issus du micro-environnement de ces cellules (179).

Par contre, le contrôle des transitions irréversibles semble impliquer l'intervention des facteurs régulateurs humoraux (par exemple l'érythropoïétine) : ces facteurs sont probablement multiples.

Ainsi, depuis quelques années, grâce à la technique de culture sur agar, on a mis en évidence l'existence de substances stimulantes et inhibitrices qui peuvent jouer un rôle dans la granulopoïèse : le C.S.F. et les inhibiteurs.

3.1. LE C.S.F.

3.1.1. DEFINITION

Le C.S.F. se définit comme une substance indispensable à la prolifération et la différenciation des C.F.C.-A.

Ce principe actif est présent dans divers liquides biologiques

et cellules. Ces dernières années, de nombreux travaux ont porté sur son identification et sur ses propriétés biologiques et physico-chimiques.

3.1.2. SOURCE DU C.S.F.

On a pu montrer que de très nombreux *tissus* ont une activité C.S.F. plus ou moins importante, mais il n'est pas possible de dire s'il s'agit là d'un lieu de stockage ou d'un lieu de synthèse.

Nous ne donnerons pas la liste complète des tissus actifs mais il convient de citer les travaux dans ce domaine de deux auteurs : Sheridan (160-161) et Bradley (20).

Avec Bradley (15) on peut classer les différents tissus en 5 catégories selon leur activité stimulante des colonies (tableau I) en culture sur agar. Il faut ajouter la moelle osseuse, les leucocytes (36-147) et les os (du moins la diaphyse des os longs (31)).

ACTIVITE MAXIMALE	: embryon entier - placenta - utérus gravide - membranes foetales -
ACTIVITE IMPORTANTE	: glande salivaire - poumon et rate de souris adulte (3 mois) - rein de souris jeune (14 jours)
ACTIVITE MOYENNE	: thymus - poumon et rate de souris jeune
ACTIVITE FAIBLE	: muscle cardiaque - cerveau - intestin de souris adulte
ACTIVITE NULLE	: muscle squelettique - foie, rein, vésicule, thymus, utérus non gravide de souris adulte.

TABLEAU I.- ACTIVITE C.S.F. DE DIFFERENTS TISSUS DE SOURIS BRADLEY (15)

Ces résultats doivent être interprétés en fonction de la technique utilisée : certains tissus sont actifs s'ils sont incorporés dans une couche nutritive mais pas sous forme d'extraits (sécrétion active comme les leucocytes). Par contre, d'autres le sont sous forme d'extraits (utérus non gravide - muscle strié). Les expériences d'ablation d'organes ont montré qu'aucun d'eux ne constitue la source unique du C.S.F. (16).

Cela signifie, soit que de nombreuses cellules différentes de l'organisme ont la propriété de produire du C.S.F., soit que ce pouvoir est réservé à un certain type de cellules présentes dans plusieurs organes.

La ou les cellules responsables de l'élaboration du C.S.F., ne sont pas connues de façon certaine. Ce problème a été particulièrement étudié au niveau des leucocytes humains.

La participation du granulocyte a d'abord été évoquée ; elle est soutenue essentiellement par Robinson (147). Cet auteur se base sur le fait que le meilleur stimulant de la moelle humaine dans le système de culture utilisé est la suspension de leucocytes humains qui est composée d'une majorité de polynucléaires. Poussant plus loin les investigations, il établit que le C.S.F. est associé, après fractionnement de leucocytes éclatés par sonication ou congélation-décongélation, à la fraction granulaire (129). De même des études *in vivo* montrent une corrélation étroite entre l'augmentation de l'activité stimulante et le nombre de granulocytes périphériques, chez des sujets leucémiques (84), et chez des sujets hématologiquement normaux après intervention chirurgicale (187).

Mais, au moins chez la souris, l'existence de grandes concentrations de C.S.F. dans les organes non granulocytaires rend improbable cette origine. Certains auteurs ont montré que, même dans un organisme granulopénique, du C.S.F. peut être élaboré (156). Chan étudie l'activité stimulante chez la souris des diaphyses de tibias ou de fémurs d'où la moelle a été expulsée (31). Elle est de 8 à 20 fois supérieure à celle de la moelle qui y était contenue. Après irradiation, elle persiste à un niveau semblable ; cette activité est donc le fait de cellules radio-

résistantes. Or il reste à la surface interne de la diaphyse des cellules endothéliales, des ostéoblastes, des fibroblastes, des macrophages. Il faut donc s'orienter vers de telles cellules pour trouver la source vraie du C.S.F.

L'étude de la cellule sécrétrice du C.S.F. a été reprise au niveau des leucocytes grâce à des techniques de séparation cellulaire.

Moore (120) sépare les leucocytes périphériques par leur propriété d'adhérence aux billes de verre ; la fraction adhérente contient 81,5 % de polynucléaires et peu de lymphocytes ; en gradient d'albumine cette fraction est divisée en deux zones : là où la densité est supérieure à 1,065 se trouvent les polynucléaires (98,5 % de la population); il n'y a pas d'activité stimulante ; la fraction de densité inférieure à 1,065 contient des lymphocytes et des monocytes adhérents et a une activité stimulante égale à 70 % de l'activité initiale de la suspension non séparée.
La cellule stimulante est donc une cellule de densité intermédiaire, qui adhère au verre ; il peut s'agir du monocyte ou d'un lymphocyte adhérent.

Par différentes techniques, Chervenick (39) obtient 6 fractions d'une suspension de leucocytes sanguins normaux humains. Le tableau II donne le détail de leur composition. Ces fractions sont utilisées sous forme de milieu conditionné ou en couche nutritive : seules celles qui contiennent des monocytes ont une activité stimulante nette sur la croissance de clones à partir de cellules médullaires humaines ou murines.

D'autres auteurs, Golde et Cline (60) arrivent à la même conclusion ; ils utilisent comme moyen de séparation des leucocytes humains sanguins, un gradient de densité isopaque-Ficoll et l'adhésivité au verre. Ils obtiennent des suspensions cellulaires assez pures où les cellules sont identifiées par des critères morphologique, cytochimique, fonctionnel et par la présence ou l'absence de sites récepteurs pour les immunoglobulines G.

Seuls le milieu conditionné de monocytes et la couche nutritive contenant la suspension monocytaire ont une action stimulante sur la moelle humaine.

TABLEAU II.- PRODUCTION DE C.S.F. PAR DES LEUCOCYTES UTILISES SOUS FORME DE MILIEU CONDITIONNE

	CELLULES	COMPOSITION	NOMBRE DE COLONIES OBTENUES POUR 10^5 CELLULES
Fraction 1	leucocytes et plaquettes	51 % de polynucléaires neutrophiles 7 % de " éosinophiles 8 % de monocytes 1 % de polynucléaires basophiles 33 % de lymphocytes	23
Fraction 2	leucocytes	41 % de polynucléaires neutrophiles 50 % de lymphocytes 6 % de monocytes 3 % de polynucléaires éosinophiles	20
Fraction 3	cellules mononucléées	58 % de lymphocytes 33 % de monocytes 7 % de polynucléaires neutrophiles 2 % de " basophiles	24
Fraction 4	monocytes	98 % de monocytes 2 % de polynucléaires neutrophiles	35
Fraction 5	lymphocytes	96 % de lymphocytes 1 % de monocytes 3 % de polynucléaires basophiles	7
Fraction 6	polynucléaires neutrophiles	90 % de polynucléaires neutrophiles 1 % de lymphocytes 9 % de polynucléaires éosinophiles	5
Fraction 7	contrôle	0	5

Les mêmes auteurs (61) ont montré que, étudiés en milieu conditionné, les macrophages tissulaires humains (pulmonaires) et ceux qui dérivent *in vitro* des monocytes, ont une activité stimulante sur la moelle humaine.

Cette hypothèse permettrait d'expliquer que de nombreux tissus et organes contiennent et élaborent le C.S.F. ; la concentration plus ou moins grande de ce facteur dépendrait de la composition cellulaire plus ou moins importante en macrophages et monocytes.

La certitude ne pourra être acquise que par l'utilisation d'un anticorps anti C.S.F. (165) marqué à la fluorescéine et par examen des tissus et des cellules en immunofluorescence. Pour cela, il est indispensable d'obtenir une très bonne purification de ce facteur.

3.1.3. DOSAGE

Pour une quantité donnée de cellules ensemencées, le nombre de colonies est en rapport avec la concentration de stimulant présent dans la culture ; dans certaines limites cette relation est linéaire ; dans sa totalité, la courbe du nombre de colonies en fonction de la concentration du stimulant laisse apparaître 3 régions (figure 1) : une zone intermédiaire (II) où il y a proportionnalité entre les 2 facteurs ; en deça (I) aucune colonie n'est décelable ; au delà (III) un plateau est atteint.

Le dosage du C.S.F. a été standardisé par différents auteurs de la façon suivante :

50 ou 75 000 cellules médullaires de souris sont ensemencées par ml de milieu. Le liquide à doser est apporté sous un volume de 0,15 ml (pour l'urine) ou 0,10 ml (pour le sérum). Le compte des colonies s'effectue au 7ème jour.

L'activité C.S.F. est rapportée à celle d'un échantillon connu, étudié dans les mêmes conditions.

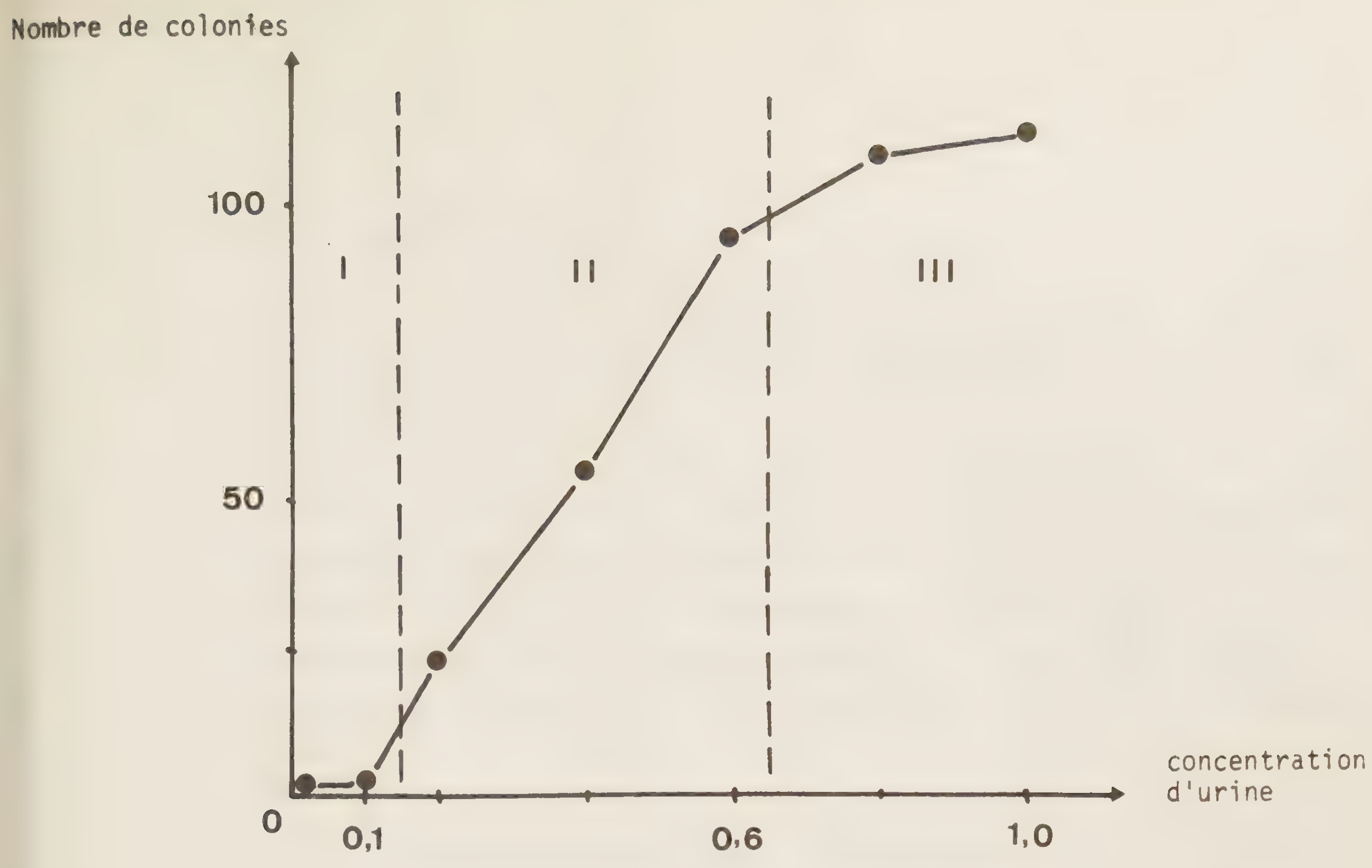


FIGURE 1 : NOMBRE DE COLONIES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'URINE STIMULANTE

(75 000 CELLULES - 7ème JOUR)

(d'après Metcalf (110))

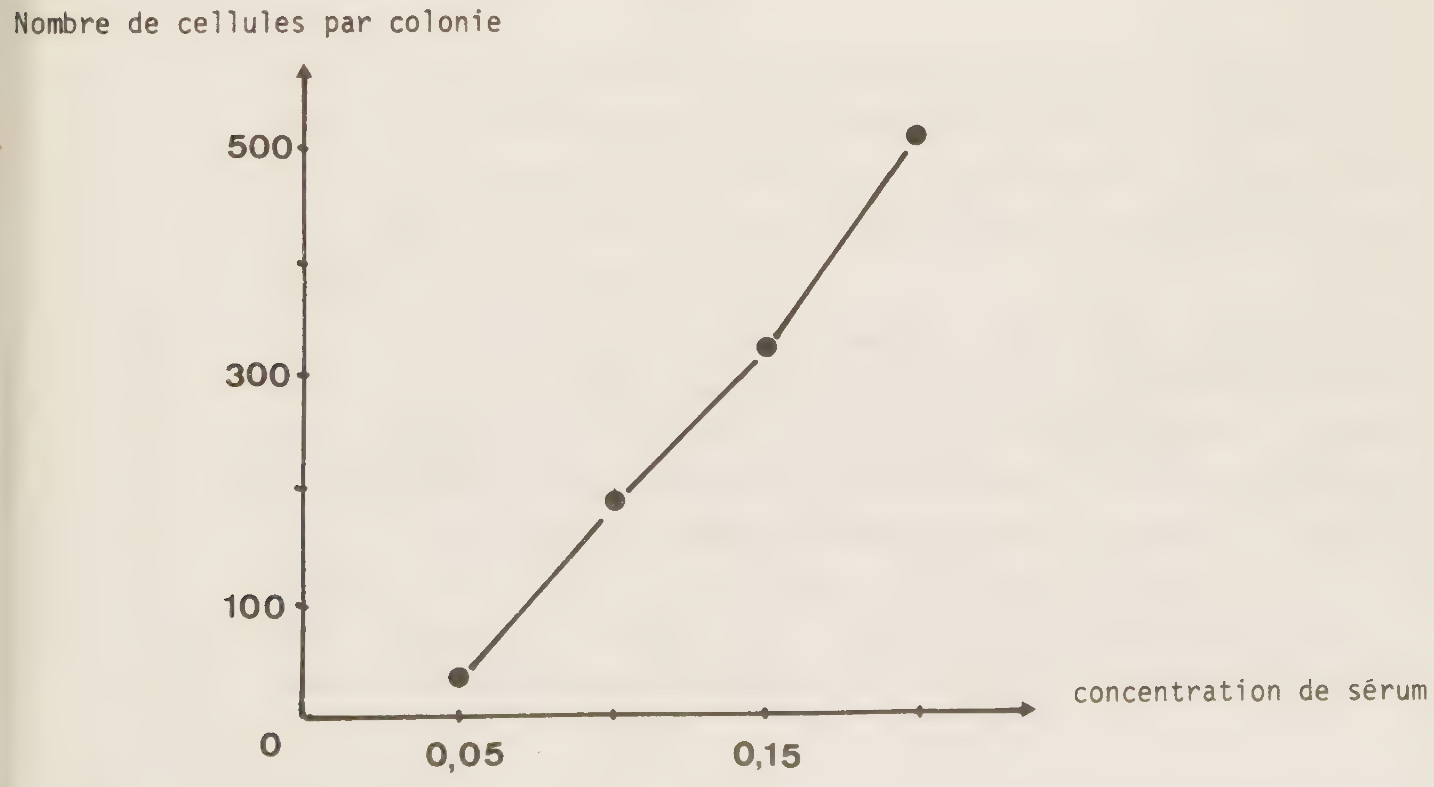


FIGURE 2 : RELATION ENTRE LA TAILLE DES COLONIES ET LA CONCENTRATION DE SERUM STIMULANT

(50 000 CELLULES - 7ème JOUR)

(d'après Robinson (146))

3.1.4. DESTINEE DU C.S.F.

Le C.S.F. est transporté par le *torrent circulatoire* ; il n'est pas impossible qu'avant de passer dans le sang il exerce à un niveau local une certaine action (32).

Le C.S.F. a, en effet, été mis en évidence dans le sérum de souris et d'hommes normaux. La quantité de C.S.F. sérique a d'abord été trouvée assez faible chez la souris (57-108-146), et nulle chez l'homme (58-113) ; en fait l'activité stimulante dans le sérum humain est le plus souvent masquée par une substance inhibitrice. Lorsque cette substance est éliminée (dialyse), tous les sérums montrent une activité stimulante (30-33).

La durée de séjour dans la circulation du C.S.F. a pu être calculée ; la demi vie moyenne du C.S.F. urinaire humain dans le sérum de souris est de 2,9 heures (114).

De la même façon, en étudiant le taux du C.S.F. sérique de souris sortant de la phase aiguë d'une infection à virus LDH, sa demi vie a été estimée à moins de 4 heures (57).

Le C.S.F. sérique de vie courte et donc de renouvellement rapide a *trois destinées* dont on ne connaît pas l'importance relative :

- l'une est la distribution et la consommation au niveau des tissus hématopoïétiques où il doit jouer son rôle de régulateur et être utilisé par les cellules;

- la deuxième est l'inactivation : elle semble se faire au moins au niveau du foie et de la rate ; le C.S.F. est dégradé ou son activité biologique est bloquée par les cellules de ces organes. La preuve en a été apportée par les techniques de perfusion *in vitro* de foie et de rate de cobaye (142). Le liquide de perfusion après passage dans ces organes est riche en C.S.F. ; si, grâce à un système clos, il traverse à nouveau le foie ou la rate, le taux de C.S.F. s'effondre. La destruction massive du foie par le tétrachlorure de carbone est suivie d'une augmentation modé-

rée du taux sérique de C.S.F. (110) ;

- la troisième est l'élimination rénale ; les urines normales contiennent le facteur stimulant (113-149) ; cette présence peut être expliquée par deux faits : soit la filtration du facteur sérique au niveau du rein, soit l'élaboration et la sécrétion par les cellules rénales. Mais après néphrectomie bilatérale ou double ligature urétérale, le taux sérique du C.S.F. de la souris s'élève (27-55). L'injection de cortisone provoque chez la souris une diurèse aiguë et intense. Elle entraîne aussi l'effondrement du taux de C.S.F. sérique et l'augmentation du taux urinaire (92) ; or si la souris est bi-néphrectomisée avant l'injection, le C.S.F. sérique n'est pas modifié (110). Le rein n'est donc pas un organe de production du C.S.F. ; le sérum y est épuré de ce facteur ; il est possible que les cellules rénales le stockent et le libèrent ensuite en culture.

L'excrétion dans les urines sous une forme biologiquement active paraît donc être la destinée majeure du C.S.F. circulant, mais il ne semble pas exister de parallèlisme étroit entre les taux sérique et urinaire.

3.1.5. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Les études initiales ont d'abord portées sur le C.S.F. sérique de souris normale ou leucémique (108-146-170) et sur le milieu conditionné produit par les cellules murines (18-137). Plus tard, grâce au C.S.F. urinaire humain, de nouvelles données ont pu être acquises (166-168).

Il est important de noter que selon son origine, ce facteur présente des propriétés quelque peu différentes ; il est donc indispensable de préciser cette origine ; sauf spécification particulière, les résultats exposés ici ont été acquis par l'étude du C.S.F. urinaire humain.

3.1.5.1. Stabilité

Le C.S.F. sérique de souris normale ou leucémique (146-108-170), le C.S.F. contenu dans du milieu conditionné de cellules de souris (18-137), et le C.S.F. urinaire humain (168), sont instables à la chaleur : la température d'inactivation est variable selon l'origine allant de 75 à 90° C. Le C.S.F. urinaire humain est stable deux semaines à 4°, une à 22°, 30 minutes à 50° et est inactivé après 30 minutes à 90°. On peut le conserver pendant très longtemps s'il est congelé à - 20° C (18 mois d'après notre observation personnelle, sous forme d'urine humaine active).

Ces facteurs ne subissent pas de perte de leur activité après concentration, traitement par l'éther ou le rayonnement ultra-violet.

Ils ne sont pas dialysables contre l'eau distillée ou le polyéthylène glycol.

Ils résistent à l'action de la DNase et de la RNase.

Le C.S.F. urinaire est en outre stable à l'urée 8 M et à des pH allant de 2 à 12.

Il est précipitable par le sulfate d'ammonium entre 40 et 68 % et par l'éthanol entre 32 et 47 %.

3.1.5.2. Migration électrophorétique et poids moléculaire

En électrophorèse, le C.S.F. migre dans la région anodique, après l'albumine. En sédimentation en gradient de sucrose, il est situé entre la sérum albumine bovine et la flagelline. La constante de sédimentation est de 3,45 S pour le C.S.F. urinaire humain, 4,1 S pour le C.S.F. de milieu conditionné d'embryon de souris et de 4,5 à 7,0 S pour le C.S.F. sérique de souris.

En chromatographie sur séphadex G-100, si le C.S.F. urinaire humain ne donne qu'une bande, le C.S.F. provenant de milieu conditionné d'embryon de souris se répartit en une série de 5 pics. Cette hétérogénéité ne semble pas due à la formation et à l'assemblage de sous unités, mais plutôt à l'association plus ou moins stable avec d'autres molécules.

L'estimation du poids moléculaire est basée sur le fait que le C.S.F. a probablement les mêmes propriétés hydrodynamiques que la sérum-albumine bovine. Selon la technique, pour le C.S.F. urinaire humain (167) ou le C.S.F. de milieu conditionné de cellule L (3) et d'embryon de souris (163), le poids moléculaire est d'environ 190 000 (chromatographie sur séphadex) ou de 45 000 (sédimentation en gradient de sucrose). Ce dernier chiffre est le plus vraisemblable car il est retrouvé pour le C.S.F. purifié.

Il est possible que selon le pH utilisé, on entraîne ou non la dissociation du complexe formé par le C.S.F. et d'autres molécules.

3.1.5.3. Nature

Il s'agit d'une glyco-protéine.

Sa composition n'est pas établie : elle contient de l'acide sialique (164) (au moins le C.S.F. provenant de milieu conditionné d'embryon de souris).

Un composant peptidique est nécessaire à son activité biologique (inactivation par α-chymotrypsine ou subtilisine) (168). Il ne contient pas d'acide nucléique (résistance à la DNase, à la RNase (166)). Il contient ou est associé à des hydrates de carbone qui le protègent de l'action de la pronase (3). En fait peu de choses sont connues de façon très certaine.

3.1.5.4. Purification

Elle a été tentée sur une vaste échelle à partir de l'urine humaine (164-166).

Elle est complexe et se fait en six étapes comportant essentiellement des techniques de chromatographie, électrophorèse en gel de polyacrylamide, etc...

Une purification de 100 000 fois par rapport aux protéines est ainsi obtenue.

3.1.6. PROPRIETES BIOLOGIQUES

3.1.6.1. Teneur et présence du C.S.F. dans les liquides biologiques

Chez l'homme

C.S.F. sérique : chez l'homme, la teneur en C.S.F. du sérum et des urines est certainement une donnée biologique importante. Stanley a pu calculer que la concentration plasmatique est approximativement de 1 ng/ml (ordre de concentration des hormones hypophysaires) (162) ; une activité biologique peut être détectée *in vitro* avec moins de 100 pg de matériel par ml de culture.

Une stimulation de colonies peut être obtenue avec une molécule de C.S.F. par 1 000 μ^3 de milieu.

C.S.F. urinaire : il n'y a pas de variations selon l'âge, le sexe et le poids. L'excrétion de C.S.F. dans les urines varie chez les sujets normaux dans la journée -avec un maximum en fin d'après-midi et le soir de 16 à 22 heures et un minimum de 24 heures à 8 heures-, et également d'un jour à l'autre. L'explication de ce phénomène n'est pas donnée.

Chez l'animal

En dehors du sérum, de l'urine, des différents tissus que nous avons cités, le C.S.F. peut être mis en évidence dans d'autres liquides biologiques : l'ascite, le liquide pleural, la lymphe du canal thoracique (110).

Plusieurs facteurs peuvent modifier le taux de C.S.F. : l'irradiation totale, les agents cytotoxiques entraînent une augmentation chez la souris et chez l'homme du taux urinaire de C.S.F. ; d'autres substances ont le même effet : les antigènes bactériens, l'endotoxine (139), les complexes antigène anticorps induisent l'apparition d'un taux sérique de C.S.F. 10 à 100 fois plus élevé que le taux de base. Le mécanisme d'action

de ces substances est encore mal expliqué : nous essaierons de le préciser plus loin.

Le taux de base du C.S.F. paraît être maintenu par la stimulation continue ou intermittente des cellules sécrétrices, par des produits bactériens provenant de saprophytes endogènes (112).

L'irradiation totale provoque l'augmentation du C.S.F. chez des souris conventionnelles probablement par libération d'endotoxine due aux lésions intestinales (138) ; cela ne se produit pas si l'on irradie des souris indemnes d'organismes pathogènes, mais l'injection d'endotoxine à ces dernières provoque l'augmentation du C.S.F. (124).

Il est peu probable qu'un mécanisme d'auto régulation joue (le taux de C.S.F. sérique réglant sa production) : quand on injecte du C.S.F. urinaire humain à des souris, le C.S.F. sérique de ces animaux ne diminue pas.

Taux du C.S.F. en pathologie

Nous nous limiterons à deux groupes d'affection : les maladies rénales et les infections. Les variations du taux de C.S.F. au cours des leucémies seront décrites dans un chapître ultérieur.

Les maladies rénales ont été étudiées chez l'homme par Chan (29). La principale anomalie est la diminution du taux urinaire et l'augmentation du taux sérique : sur 23 malades ambulatoires non infectés, 9 ont un taux sérique élevé, 12 un taux urinaire abaissé ; sur 15 malades hospitalisés, infectés (grande insuffisance rénale aiguë ou chronique) tous ont un taux sérique élevé et un taux urinaire nul.

Du fait de l'atteinte rénale, l'épuration de C.S.F. est perturbée ; ce défaut est dans une certaine mesure sélectif pour ce facteur car l'activité stimulante exprimée en fonction des protéines urinaires est toujours inférieure à la normale.

Les maladies infectieuses ont fait l'objet d'études chez l'homme et chez l'animal. En général, lors de périodes aiguës d'infections bactériennes et virales, le taux de C.S.F. est augmenté dans le sang et

les urines ; il diminue pendant la convalescence -d'abord dans les urines, puis dans le sérum- (58-185).

57 % des malades atteints de mononucléose infectieuse (31 sur 54) ont une activité C.S.F. élevée dans le sérum ; ce taux sérique est en corrélation avec l'évolutivité de la maladie : à un taux élevé correspond une évolution courte et inversement (116).

Parmi les autres maladies virales, les oreillons, l'herpès, la varicelle, la rubéole s'accompagnent dans plus de 50 % des cas d'une élévation du taux sérique du C.S.F. (52).

Ces constatations faites au cours des maladies infectieuses doivent être rapprochées des résultats expérimentaux observés après injection d'endotoxine chez l'animal et l'homme (en clinique humaine, cette technique est utilisée pour évaluer les réserves granulocytaires médullaires). En général, dans les affections bactériennes, le taux de granulocytes est élevé ; il est possible que les produits bactériens stimulent la granulopoïèse, mais ils peuvent agir par l'intermédiaire du C.S.F..

McNeill (86) montre que l'injection chez la souris de flagelline de salmonelle, d'endotoxine, d'adjuvant de Freund augmente la fréquence des C.F.C.-A et le taux du C.S.F. sérique.

Pour Metcalf (95), après injection de ces mêmes produits ou de certains vaccins antibactériens, le taux sérique de C.S.F. augmente brusquement pour atteindre plus de 100 fois la valeur de départ. La réponse maximale est obtenue en 3 à 6 heures et se maintient 24 heures ; des injections répétées induisent des pics d'activité C.S.F. répétés.
Pourtant, lors d'étude *in vitro*, le même auteur a pu montrer que les antigènes bactériens n'ont pas d'action spécifique sur la croissance des colonies.

D'autres travaux permettent de préciser l'action de ces substances : en milieu liquide, les cellules médullaires peuvent produire du C.S.F. et l'addition de flagelline à ces cultures augmente la production de C.S.F. (110). Les produits bactériens agissent en augmentant la production tissulaire de C.S.F. ; cela n'exclut pas une action directe sur la granulopoïèse.

3.1.6.2. Propriétés immunologiques et spécificité

Le C.S.F. urinaire humain est antigénique chez le lapin (165). L'activité anticorps est associée aux gammaglobulines 7 S et 19 S (chromatographie sur séphadex G-200). Il s'agit d'une neutralisation de l'activité C.S.F. : en effet, en immunoélectrophorèse on n'observe pas de ligne de précipitation contre des concentrés d'urine humaine mais si l'on mélange anticorps et urine active, la formation des colonies est inhibée. Il n'existe pas d'effet toxique sur la C.F.C..

En se basant sur l'existence de cette inhibition, il a été démontré que le C.S.F. sérique et urinaire humains sont antigéniquement semblables ; ils sont différents du C.S.F. présent dans le sérum ou l'urine de souris et dans le milieu conditionné de cellules embryonnaires de souris ; mais il existe des relations entre C.S.F. humain et murin : l'inactivation est réelle, bien que partielle.

L'activité stimulante des colonies ne paraît pas spécifique de l'espèce : des préparations de C.S.F. humain (sérum ou urine) stimulent des cellules médullaires de souris et induisent la formation de colonies en agar (162). Cependant, le milieu conditionné de rate humaine stimule les cellules médullaires humaines ou murines, mais le milieu conditionné de rate de rongeur n'est pas actif sur les cellules humaines.

En fait, l'activité stimulante est recherchée par un test biologique -la formation de colonie *in vitro*- et des substances légèrement différentes par leurs propriétés physico-chimiques, sont douées de cette activité. Probablement seul un fragment commun de la molécule en est responsable.

3.1.6.3. Action du C.S.F. in vitro

Le C.S.F. est caractérisé essentiellement par ses propriétés biologiques *in vitro*.

- Il est indispensable à l'initiation et au développement des colonies cellulaires : les expériences de repiquage montrent qu'en l'absence de stimulant dans le milieu receveur, les colonies transplantées ne survivent pas (131).

- La relation entre la concentration de C.S.F. et le nombre de colonies est linéaire dans une zone intermédiaire.

Mais certains facteurs modifient le nombre de clones : Bradley (22) a montré que l'adjonction de globules rouges dans le milieu de culture, en présence d'une quantité optimale de stimulant, augmente le nombre de clones formés. Il s'agit d'un effet potentialisant sur le C.S.F.

- La taille des colonies dépend du type de stimulant ; mais surtout de la concentration du C.S.F. (figure 2, p 47). Ce facteur agit comme un stimulus de la prolifération, soit en raccourcissant le temps moyen du cycle cellulaire, soit en modifiant la différenciation des cellules filles de façon telle qu'une plus grande proportion reste de type parental, capable de se diviser. Le C.S.F. est capable de raccourcir le temps de latence moyen (temps séparant la mise en culture de la première division cellulaire).

- La quantité de C.S.F. résiduelle dans les cultures après formation de colonies est réduite (94) : il est possible que les cellules qui se divisent utilisent ce facteur comme métabolite ou bien qu'elles l'adsorbent de façon non spécifique, ou encore que les produits de dégradation cellulaire l'inactivent.

- La transformation cellulaire de granulocytes en macrophages ne dépend pas de la concentration de C.S.F. mais plutôt de sa nature et de son origine. Il y aurait deux facteurs stimulants différents : l'un induit la formation de colonies granuleuses (le type en est le milieu conditionné de cellules médullaires de souris atteinte de leucémie myélo-monocytaire), et l'autre, celle de colonies macrophagiques (le type est le C.S.F. urinaire ou sérique) (110).

3.1.6.4. Action du C.S.F. in vivo

Relation avec la leucocytose

Nous avons dit que dans certaines situations pathologiques où la production de granulocytes et de monocytes est augmentée, le taux de C.S.F. est modifié. On peut donc penser que, comme l'érythropoïétine en ce qui concerne l'érythropoïèse, le C.S.F. a un rôle régulateur dans la granulopoïèse *in vivo*. Trois types d'étude qui tentent d'établir un parallélisme entre le taux de granulocytes circulants et celui du C.S.F., renforcent encore cette hypothèse : étude des neutropénies spontanées, des neutropénies et des hyperleucocytoses provoquées.

Les neutropénies spontanées existent chez l'animal et l'homme.

Dans une race particulière de *chiens* ("Grey collee dogs") certains animaux présentent une neutropénie cyclique qui se transmet comme un caractère autosomal récessif (83) ; cette neutropénie n'est pas due à un raccourcissement de la durée de vie intravasculaire des granulocytes mais à un défaut de la production médullaire (46). L'anomalie réside soit au niveau de la C.S.H. (car les autres lignées sont atteintes), soit au niveau des facteurs de régulation. L'activité C.S.F. dans les urines de ces chiens a été mesurée par Dale (45). Au moment de la période neutropénique, le taux de C.S.F. urinaire est très bas ou nul ; il augmente avant (24 à 48 heures) ou au moment de la montée du chiffre leucocytaire ; le taux maximal est atteint avant le pic granulocytaire ; le taux de C.S.F. décroît ensuite pour se situer à un niveau très faible pendant toute la période de leucocytose normale.

Chez l'homme la même situation a été décrite (90).

L'induction d'une neutropénie chez la souris est effectuée par injection de sérum antineutrophile (158), traitement par des agents alkylants (157) ou irradiation totale (64-117) ; une élévation du taux sérique de C.S.F. est observée.

Les hyperleucocytoses ont été provoquées par injection de vac-

cin anticoquelucheux (159) ou chez l'homme par des interventions chirurgicales (187). Elles s'accompagnent d'une augmentation du taux urinaire ou sérique du C.S.F.

Ainsi les variations concomittentes du C.S.F. et de la leucocytose conduisent à lui accorder un rôle dans la granulopoïèse *in vivo* ; mais il faut remarquer que la chronologie des faits est difficile à établir et que ces variations sont, selon les auteurs, parallèles ou inverses.

En outre, chez les souris normales, il n'y a pas de corrélation précise entre le taux du C.S.F. et celui des polynucléaires sanguins ou des C.F.C.-A médullaires (110) ; les souris "exemptes de germes" ont un taux sérique de C.S.F. très bas mais une granulopoïèse médullaire et sanguine normale (13-109).

Effet de l'injection de C.S.F.

Injecté à des souris, le C.S.F. entraîne une polynucléose, conséquence d'un accroissement de la production médullaire (18-115). Cet effet est limité dans le temps, en raison de la courte durée de vie de ce facteur. Il provoque une augmentation du nombre des C.F.C.-A et des cellules formant des agrégats ; ces cellules commencent leur prolifération dès la mise en culture, et non après la période de latence normale de 12 heures. Si le C.S.F. est injecté à intervalles réguliers, la leucocytose n'est ni prolongée, ni majorée : le recrutement des C.F.C.-A à partir de C.S.H. est donc limité.

La principale critique de ces expérimentations est que le produit injecté (milieu conditionné riche en C.S.F. ou urine humaine concentrée) n'est pas pur ; l'action obtenue peut être due à d'autres substances.

Ainsi, outre son action *in vitro*, le C.S.F. semble jouer un rôle dans la régulation de la granulopoïèse physiologique. Son mécanisme d'action n'est pas certain, mais les études *in vitro* sont en faveur :

- de la stimulation de la C.F.C.-A et du pool proliférant,
- ou du recrutement de nouvelles cellules progénitrices à partir des C.S.H.,
- ou de ces deux hypothèses.

3.2. INHIBITEURS DE LA FORMATION DES COLONIES

A côté des substances stimulantes, de nombreux auteurs ont décrit des facteurs inhibiteurs de la granulopoïèse (chalone granulocytaire...) (72-150-151).

La technique de culture décrite dans les chapîtres précédents a permis de mettre en évidence une autre substance inhibitrice, dont nous parlerons exclusivement. Son existence a d'abord été soupçonnée par Stanley (170) chez la souris Balb/c, puis chez l'homme, où Chan (33) remarque plus tard que le sérum des malades insuffisants rénaux montre, après hémodialyse, une activité stimulante impossible à mettre en évidence auparavant.

3.2.1. TECHNIQUE DE RECHERCHE

Un nombre déterminé de cellules médullaires de souris est mis en culture dans un milieu contenant de l'agar, stimulé par une quantité importante de C.S.F. de haute activité (sérum dialysé d'insuffisants rénaux ou sérum dialysé de souris traitées à l'endotoxine). Il se développe un certain nombre de clones cellulaires. Si à cette culture on ajoute un sérum non traité contenant une substance inhibitrice, le nombre de clones obtenu sera plus faible.

L'inhibition s'exprime par le pourcentage de réduction du nombre de colonies.

3.2.2. ORIGINE

Pour Metcalf (105) la cellule qui est à l'origine de ce facteur est le granulocyte ; Paran (130) estime aussi que le granulocyte est inhibiteur pour le développement des colonies en agar.

Shadduck (156) admet que les deux régulateurs (C.S.F. et inhibiteur) sont contenus dans le polynucléaire neutrophile ; le rapport de ces deux activités se modifie avec le temps d'incubation des cellules : l'effet inhibiteur diminue progressivement.

Mais deux auteurs étudiant des suspensions cellulaires presque pures de granulocytes arrivent à des résultats opposés : Moore (120) n'obtient pas d'inhibition ; Chervenick (39) montre que le milieu conditionné fait à partir de $2{,}5.10^6$ polynucléaires est inhibiteur sur la formation des colonies.

3.2.3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

- L'inhibiteur sérique de la formation des colonies en agar se conserve plusieurs mois congelé à - 20° C (33) ; il est labile à la chaleur (57). Il n'est pas dialysable, mais après dialyse contre de l'eau distillée à 4° il se forme un précipité dans le sac à dialyse ; ce précipité contient la substance inhibitrice, alors que le surnageant contient le C.S.F.

Chan a montré qu'après un jour de dialyse, 75 % de l'activité inhibitrice disparaissait (figure 3) ; cette réduction reste stable jusqu'au 3ème jour et après 4 jours de dialyse, atteint 80 à 90 % de l'activité initiale. Le précipité obtenu après dialyse, redissous dans du PBS, montre une activité inhibitrice qui garde la même spécificité d'espèce que le sérum non dialysé entier. Le dialysat n'a pas d'activité.

- Sa migration électrophorétique s'effectue dans les régions α-globulines, albumine et surtout β-globulines.

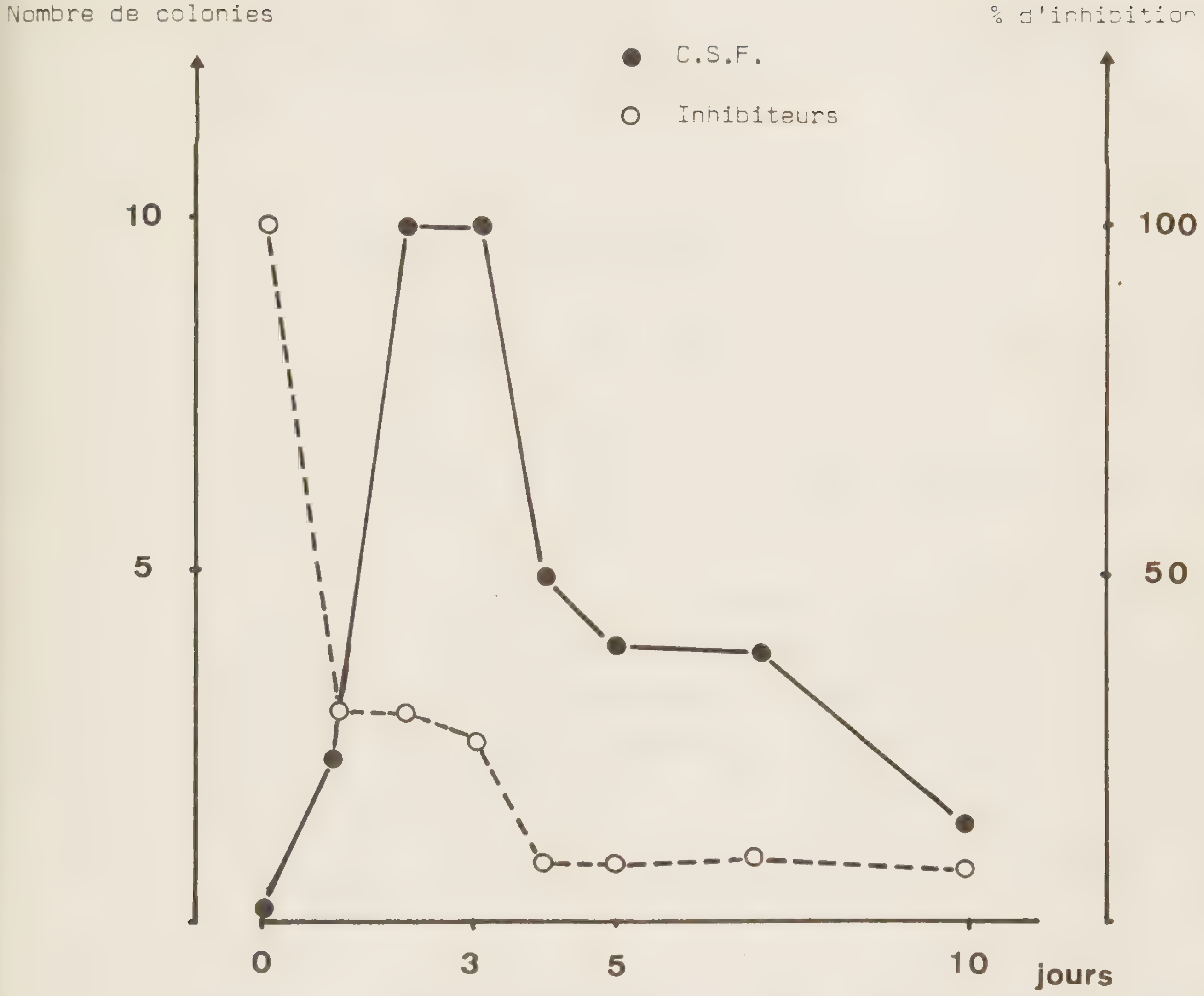


FIGURE 3 : ACTION SUR LE C.S.F. ET LES INHIBITEURS DE LA DIALYSE A 4° C

CONTRE L'EAU DISTILLEE EN FONCTION DU TEMPS

(d'après Chan (33))

- Il s'agit d'une lipoprotéine d'un poids moléculaire de 200 000 environ (110).

- L'élimination de ces substances inhibitrices peut se faire par chauffage (4 heures à 58° C), par dialyse (3 jours contre de l'eau distillée), par traitement par le chloroforme, l'éther ou le kaolin (28-52).

3.2.4. PROPRIETES BIOLOGIQUES

- L'inhibiteur est présent dans 98 % des sérums de sujets normaux (30-33); il n'y a pas de relation avec l'âge, le sexe des sujets ou leur taux de C.S.F. sérique et urinaire.
Au cours des infections, le taux d'inhibiteur sérique, normalement compris entre 50 et 100 %, s'abaisse.

- Le C.I.F.* montre une relative spécificité d'espèce (28-33). Le sérum non traité de souris BALB inhibe l'action stimulante du sérum, de l'urine ou d'un milieu conditionné d'embryon de souris, mais n'inhibe pas ou très peu le C.S.F. sérique ou urinaire humain ; inversement, le sérum non traité humain inhibe l'action stimulante du sérum ou de l'urine humaine (et cela de façon presque équivalente) mais beaucoup moins la formation de colonie induite par le sérum, l'urine ou le milieu conditionné de souris.

- *In vitro,* l'inhibiteur réduit le nombre et la taille des colonies (28) ; il induit la transformation prématurée des cellules granuleuses en macrophages.

Le mécanisme de cette action n'est pas certain ; on sait que cette substance n'est pas toxique pour la C.F.C.-A ; il est peu probable qu'elle bloque le site de fixation du C.S.F. sur cette cellule ; peut-être agit-elle comme antagoniste du C.S.F. en se combinant à lui, mais *in vitro* il ne semble pas exister de complexe C.S.F.-inhibiteur stable (33).

* C.I.F. = colony-inhibiting factor (nom donné par McNeill aux inhibiteurs lipoprotéiques de la granulopoïèse (86)).

CHAPITRE 4

MATERIEL ET METHODES

4.1. MATERIEL

4.2. METHODES

Notre but est d'étudier chez l'homme normal et leucémique la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices de la granulopoïèse et certains de leurs facteurs de régulation.

Cela nous a été permis par l'utilisation de la technique de culture des cellules hématopoïétiques en gel d'agar.

4.1. MATERIEL

Notre travail, échelonné sur un peu plus d'un an, a porté sur l'étude de sujets normaux et de malades atteints de leucémies.

4.1.1. SUJETS ETUDIES

L'ensemble de ces sujets peut être réparti en deux groupes : un groupe témoin - un groupe malade.

4.1.1.1. Groupe témoin

Pour ce qui concerne l'étude du C.S.F., les onze sujets témoins sont des adultes jeunes volontaires, hématologiquement et cliniquement normaux et en particulier exempts de toute infection.

Le groupe témoin des études des C.F.C.-A est assez hétérogène ; il s'agit de 37 malades hospitalisés au C.H.U. de GRENOBLE ; ces malades, hommes et femmes, âgés de 25 à 70 ans, ne présentent pas d'anomalies hématologiques majeures et en particulier pas d'hématosarcome. Le plus souvent, la moelle hématopoïétique a été prélevée à l'occasion d'une ponction sternale demandée dans un but d'examen cytologique et appartient alors à des malades atteints d'inflammation chronique, de cancers sans atteinte médullaire, ou porteurs d'anémie modérée.

Parfois le prélèvement est fait au cours d'intervention chirurgicale sur des màlades hospitalisés dans le service du Dr Gauthier et opérés pour diverses raisons (hernie - sympathectomie - chirurgie traumatique).

Aucune mise en culture de sang témoin n'a été faite.

4.1.1.2. Groupe leucémique

Il est constitué de malades hospitalisés dans le service du Pr Hollard au C.H.U. de GRENOBLE ; sont compris dans ce groupe des leucémies aiguës, essentiellement myéloblastiques, mais aussi lymphoblastiques, monoblastique et promyélocytaires ; des leucémies chroniques exclusivement myéloïdes auxquelles on a adjoint des splénomégalies myéloïdes ; enfin des états préleucémiques.

Le tableau I indique la répartition de ces malades et le type d'étude effectuée ; pour la plupart des malades, ont été étudiés au même moment le comportement *in vitro* de la moelle et (ou) du sang et le C.S.F. urinaire ; beaucoup d'entre eux ont été explorés plusieurs fois.

TABLEAU I.- NOMBRE DE MALADES ETUDIES EN FONCTION DU DIAGNOSTIC

DIAGNOSTIC	NOMBRE GLOBAL	NOMBRE DE MALADES ETUDIES pour les C.F.C.-A	pour le C.S.F.u
LEUCEMIES AIGUES	31	25	26
L.A.L.	4	3	4
L.A.M.	24	21	20
L.A. promyélo.	2	1	1
L.A. monoblast.	1	0	1
SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS	23	16	22
L.M.C.	21	14	20
Splén. myéloïde	2	2	2
ETATS PRELEUCEMIQUES	3	3	3
TOTAL	55	44	51

Le diagnostic a été porté selon les critères cliniques et hématologiques habituels : le type cytologique des leucémies aiguës est précisé par des colorations cytochimiques ; la présence de chromosome Ph1 ou à défaut l'effondrement des PAL (phosphatases alcalines leucocytaires) affirment la leucémie myéloïde chronique ; dans les états préleucémiques, sont inclus 3 cas de dyshématopoïèse : une anémie réfractaire à myéloblastose partielle (10) ; un malade porteur d'un trouble important de la granulopoïèse et qui a évolué vers une leucémie aiguë vraie ; un malade porteur d'une tuberculose des organes hématopoïétiques (70).

Les tableaux II et III rassemblent les différents malades étudiés et précisent pour chacun, le diagnostic, le sexe, l'âge, certains critères de diagnostic et la durée d'évolution totale (du diagnostic au décès, ou du diagnostic au moment de la rédaction de ce travail) : ces derniers cas sont signalés par une astérisque* .

Il est important de préciser que nous nous sommes efforcés, autant que cela était possible sans porter préjudice au malade, d'effectuer nos prélèvements avant la mise en train de toute thérapeutique -que cette thérapeutique soit spécifique (chimiothérapie), non spécifique (anti infectieux...) ou substitutive (sang et ses dérivés).

4.1.2. MATERIEL ETUDIE

4.1.2.1. Le C.S.F. a été recherché et dosé uniquement dans les urines

L'urine étudiée est un échantillon d'une diurèse de 24 heures prélevée sur azide de sodium (0,2 %) dans une cantine en matière plastique et dialysée.

La dialyse est effectuée en sac Visking, à 4° C, pendant 3 jours, contre de l'eau distillée. Les proportions sont en règle les suivantes : un volume d'urine pour 100 d'eau, qui sera changée 2 fois. Il apparaît un précipité que l'on élimine par centrifugation ; le surnageant est conser-

TABLEAU II.- MALADES ETUDIES : L.M.C.

NUMERO	SEXE	AGE (années)	DIAGNOSTIC	CRITERE DE DIAGNOSTIC Ph1	P.A.L.[1]	DUREE D'EVOLUTION (mois)
1	F	35	L.M.C.	nf[2]	1	26
2	M	63	L.M.C.	nf	1	7 *
3	M	70	L.M.C.	+	11	7 *
4	M	73	L.M.C.	+	4	9 *
5	F	43	L.M.C.	+	15	64
6	F	73	Splén. Myél.	N	75	108 *
7	F	28	L.M.C.	nf	4	113
8	F	49	L.M.C.	nf	6	8 *
9	F	68	L.M.C.	+	7	30
10	F	33	L.M.C.	nf	5	10 *
11	F	36	L.M.C.	nf	12	74 *
12	F	32	L.M.C.	nf	7	48
13	M	67	Splén. Myél.	N	nf	144
14	M	63	L.M.C.	nf	4	75 *
15	M	40	L.M.C.	nf	nf	27
16	M	73	L.M.C.	+	2	3
17	F	43	L.M.C.	+	7	62
18	F	44	L.M.C.	nf	5	6 *
19	F	14	L.M.C.	nf	nf	22
20	M	66	L.M.C.	+	nf	3
21	F	66	L.M.C.	+	38	50
22	M	58	L.M.C.	nf	9	61

[1] P.A.L. = phosphatases alcalines leucocytaires - taux normal 42 à 84 - dosages au début de l'évolution

[2] nf = non fait ou mitoses non obtenues

TABLEAU III.- MALADES ETUDIES : LEUCEMIES AIGUËS ET PRELEUCEMIES

NUMERO	SEXE	AGE (années)	DIAGNOSTIC	DUREE D'EVOLUTION (mois)	NUMERO	SEXE	AGE (années)	DIAGNOSTIC	DUREE D'EVOLUTION (mois)
23	F	56	L.A.M.	2	40	M	23	L.A.M.	36 *
24	M	28	L.A.L.	1	41	F	58	L.A. Mon	2
25	F	16	L.A.L.	4 *	42	F	69	L.A.M.	4 *
26	M	21	L.A.L.	12	43	M	50	L.A.M.	3
27	F	30	L.A.M.	46 *	44	F	71	L.A.M.	13
28	M	26	L.A.M.	1	45	M	79	L.A.M.	5
29	F	78	L.A.M.	2	46	F	85	L.A.M.	3
30	M	20	L.A.M.	3	47	F	23	L.A. PM	17 *
31	M	76	L.A.M.	10	48	M	70	L.A.M.	2
32	M	50	L.A.M.	2	49	M	70	L.A.M.	4
33	M	49	L.A.M.	2	50	F	80	L.A.M.	16 *
34	F	71	L.A.M.	1	51	F	83	L.A.M.	12 *
35	F	77	L.A.M.	1	52	M	69	L.A.M.	2
36	F	76	L.A.M.	2	53	M	67	L.A.M.	4
37	F	71	L.A. PM	3	54	F	83	Etat Pr.L.	6 *
38	M	35	L.A.M.	4 *	55	F	49	Etat Pr.L.	6
39	M	20	L.A.L.	8 *	56	M	66	Etat Pr.L.	4

L.A.M. = leucémie aiguë myéloblastique

L.A.L. = leucémie aiguë lymphoblastique

L.A. PM = leucémie promyélocytaire

L.A. Mon = leucémie aiguë monoblastique

Etat Pr.L. = état préleucémique

vé à - 20° C et sera filtré sur filtre Millipore (0,45 μ) après décongélation juste avant l'emploi.

4.1.2.2. Le matériel utilisé pour les études de C.F.C.-A est le sang ou la moelle hématopoïétique

Le sang est prélevé de façon stérile par ponction veineuse. 20 ml sont recueillis dans un flacon de verre stérile contenant de l'héparine (100 U.I. d'héparine pure Laroche par flacon).

La moelle hématopoïétique est prélevée après ponction le plus souvent sternale, parfois iliaque, au trocard de Croizat : 2 ou 3 ml sont aspirés ; la plus grande partie est recueillie dans un tube en plastique stérile contenant 0,15 ml d'héparine pure ; le reste sert à faire des frottis pour l'examen cytologique.

Du fait de ce mode de prélèvement, la moelle est généralement souillée par le sang périphérique ; la dilution peut être très importante et gênante en cas d'aplasie ou d'hypoplasie ou de L.M.C.. Certains auteurs (127) ont essayé de quantifier les C.F.C.-A en exprimant leur nombre par ml de moelle ou en fonction du compte différentiel des cellules médullaires ; nous n'avons pas fait de tels calculs mais nous nous sommes efforcés d'éviter toute contamination importante par le sang.

Les techniques utilisées se décomposent en trois temps :

- mise en culture,
- incubation,
- lecture, c'est-à-dire compte et appréciation des colonies.

Les manipulations concernant la mise en culture nécessitent une stérilité parfaite. Elles sont faites sous une hotte à flux laminaire horizontal.

4.2. METHODES

4.2.1. METHODE D'ETUDE DE LA CELLULE PROGENITRICE GRANULEUSE HUMAINE

Il s'agit d'une culture en agar à double couche : une couche inférieure contenant les leucocytes humains, couche stimulante et nutritive, ("feeder layer"), et une couche supérieure qui contient la suspension de cellules médullaires ou sanguines à étudier ; dans cette dernière couche se développent les colonies.

4.2.1.1. Le milieu de culture

La base en est le milieu de Mc Coy 5 A ; du sérum de veau foetal et des substances nutritives y sont ajoutées selon la composition indiquée dans le tableau IV.

Milieu de Mc Coy 5 A	800	ml	= 988 ml
Sérum de veau foetal	150	"	
Bicarbonate de sodium à 7,5 %	6	"	
Pyruvate de sodium 100 mM	10	"	
Vitamines Eagle's MEM (x 100)	4	"	
Acides aminés Eagle's MEM (x 50)	8	"	
Acides aminés non essentiels Eagle's MEM (x 100)	4	"	
Glutamine Eagle's MEM 200 mM	4	"	
L sérine (21 mg/ml)	0,4	"	
L asparagine (10 mg/ml)	1,6	"	

TABLEAU IV.- COMPOSITION DU MILIEU DE MAC COY MODIFIE

Ce milieu est filtré sur Millipore (0,45 µ). Sa préparation est effectuée en règle le jour de son utilisation ; il est maintenu alors à 38° C jusqu'à ce moment ; toutefois il peut se conserver 24 à 48 heures à 4° C.

Tous les produits utilisés viennent des laboratoires Gibco.

4.2.1.2. La solution d'agar

L'agar (special Agar noble - Laboratoires Difco) est mis en solution dans de l'eau distillée (3 g ou 5 g d'agar pour 100 ml d'eau selon la concentration désirée).

Le mélange est autoclavé dans le double but de stériliser et de dissoudre l'agar. Cette substance, fluide à une température supérieure à 40° C, se transforme en un gel à des températures inférieures.

4.2.1.3. La préparation de la couche inférieure nutritive

Elle nécessite d'abord l'obtention de leucocytes humains : 25 ml de sang d'un donneur, hématologiquement normal, sont prélevés stérilement et recueillis dans plusieurs tubes héparinés (héparine pure Laroche). Le sang est laissé à sédimenter pendant une heure à la température ambiante, puis le surnageant riche en leucocytes est recueilli à l'aide d'une pipette Pasteur ; la suspension leucocytaire est numérée en cellule hématimétrique ; on obtient 5 à 15.10^6 leucocytes par ml.

Le milieu de culture décrit plus haut, maintenu à 38° C, est mélangé à une solution d'agar à 5 % pour obtenir une concentration finale de l'agar de 0,5 %.

La suspension cellulaire est ajoutée au mélange (milieu et agar) refroidi à 37° C ; la concentration finale est de 1.10^6 cellules par ml.

L'ensemble (milieu, agar et cellules) est alors réparti sous un volume de 1 ml dans des boîtes de Pétri (boîtes de 35 mm de diamètre,

stériles, à usage unique : Falcon Plastics).

La gélification de l'agar se fait en 10 à 15 minutes à la température du laboratoire.

La couche inférieure nutritive est alors prête à l'emploi, soit immédiat, soit ultérieur : son activité persiste pendant 14 jours en atmosphère humide à 37° C.

4.2.1.4. La préparation de la couche supérieure

Après sédimentation 1 à 2 heures à la température du laboratoire de la moelle ou du sang, on prélève le plasma surnageant à la pipette Pasteur.

Les grains de moelle sont dissociés par passages successifs à travers une aiguille de calibre 5/10ème ; après deux lavages dans du liquide de Hanks, les cèllules nucléées sont numérées.

Les leucocytes contenus dans le plasma sont lavés deux fois dans du liquide de Hanks, puis numérés.

Le milieu de culture utilisé est le même que celui qui a été décrit plus haut ; on lui adjoint une solution d'agar à 3 % dans les mêmes conditions que précédemment (concentration finale : 0,3 %).

A ce mélange (milieu et agar), refroidi à 37° C, on ajoute la suspension cellulaire en quantité suffisante pour obtenir une concentration de 2.10^5 cellules nucléées par ml ; dans certains cas et surtout en pathologie, le nombre de cellules mises en culture sera plus faible : 1.10^5 ou 5.10^4 par ml.

L'ensemencement des boîtes de Pétri avec les cellules médullaires ou sanguines se fait sous forme d'un volume de 1 ml de mélange (milieu, agar et cellules) déposé sur la couche nutritive gélifiée.

Cinq boîtes sont ensemencées avec la même suspension cellulaire.

4.2.1.5. L'incubation

Après obtention d'un gel (10 à 15 minutes à la température du laboratoire) les boîtes sont mises à incuber à 37° C dans une atmosphère

saturée en vapeur d'eau et contenant de l'air enrichi en CO_2 (7,5 %).

La durée de l'incubation est de 15 à 18 jours.

4.2.1.6. Lecture des résultats

La lecture des boîtes, c'est-à-dire le compte des colonies, l'examen de leur taille, de leur morphologie, se fait en général au 15ème jour à l'aide d'un microscope inversé de grossissement 40. Est compté comme colonie tout amas de plus de 50 cellules (les amas de moins de 50 cellules ou agrégats ne sont pas comptés).

Le résultat final est la moyenne de 3 à 5 boîtes.

La composition cellulaire des colonies doit être étudiée après coloration ; les colonies sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur, étalées sur lame de verre, colorées au May Grunwald Giemsa et examinées au fort grossissement.

Il est important de préciser que chaque manipulation comprend la mise en culture d'une moelle de référence provenant d'un sujet témoin, ceci dans le but de vérifier les capacités stimulantes de la suspension leucocytaire et l'absence de toxicité du milieu. Souvent, les cellules médullaires et sanguines leucémiques ont été cultivées, d'une part en présence d'un stimulant et, d'autre part en son absence (formation de colonie spontanée).

Un schéma de la méthode décrite est donné ci-après (figure 1).

4.2.2. METHODES D'ETUDE DU C.S.F.

La technique adoptée dérive de celle mise au point par Bradley et Metcalf en 1966 (16) et modifiée par Metcalf en 1970 (94).

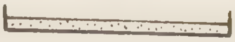
Le système utilisé ici ne comporte qu'une seule couche dans laquelle sont mélangés le milieu, l'agar, les cellules médullaires de souris et le produit stimulant à doser (urine).

FIGURE 1

TECHNIQUE DE CULTURE DE MOELLE HUMAINE EN AGAR

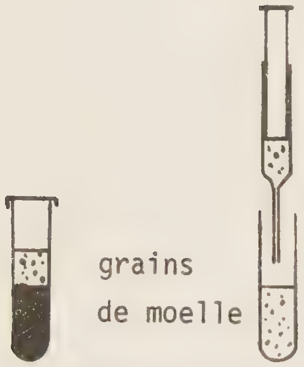
Préparation de la couche nutritive leucocytaire

leucocytes en suspension dans
- 9 volumes de milieu de Mc Coy modifié
- 1 volume d'agar à 5 %



10^6 leucocytes par ml de milieu (concentration d'agar à 0,5 %)

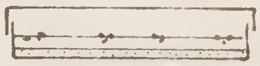
Mise en culture de la suspension médullaire

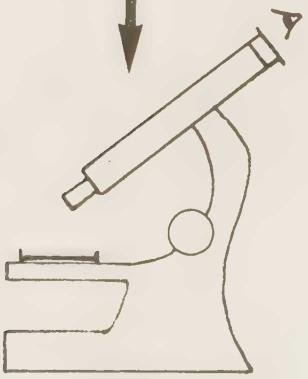


cellules médullaires en suspension dans :
- 9 volumes de milieu de Mc Coy modifié
- 1 volume d'agar à 3 %

2.10^5 cellules médullaires par ml de milieu (concentration d'agar à 0,3 %)

Atmosphère humide
CO_2 à 7,5 %
T = 37° C - 15 jours





compte des colonies

4.2.2.1. Le milieu de culture

Il est préparé en 2 étapes successives séparées par une filtration.

La première étape est l'obtention d'un milieu de Eagle modifié, en double concentration. Le tableau V en donne la composition exacte ; remarquons qu'il contient 20 % de sérum de veau foetal et 10 % de sérum de cheval. Ce milieu est filtré sur filtre Millipore 0,45 μ.

Milieu de Eagle (x 10)	100	ml	
Bicarbonate de sodium (2,8 %)	80	"	
Vitamines Eagle's MEM (x 100)	10	"	
Acides aminés essentiels Eagle's MEM (x 100)	10	"	
Acides aminés non essentiels Eagle's MEM (x100)	10	"	
Glutamine (200 mM)	10	"	
Pyruvate de sodium (2,2 %)	5	"	463,96 ml
Sérum de veau foetal	100	"	
L sérine (21 mg/ml)	1	"	
Pénicilline (200 000 u/ml)	0,58	"	
Streptomycine (200 mg/ml)	0,38	"	
Rouge de Phénol (1 %)	2		
Sérum de cheval	50	"	
Eau distillée	85	"	

TABLEAU V.- COMPOSITION DU MILIEU DE EAGLE MODIFIE EN CONCENTRATION DOUBLE

Les lots commerciaux ou de préparation locale du sérum de veau foetal et du sérum de cheval sont d'activité variable : certains sont inhibiteurs en culture de cellules et il est nécessaire de les tester

avant leur emploi ; le tableau VI indique les variations que nous avons constatées du taux du C.S.F. urinaire selon les différents lots de ces substances

	SVF 1 SC 1	SVF 2 SC 1	SVF 3 SC 1	SVF 4 SC 1	SVF 5 SC 1	SVF 5 SC 2	SVF 5 SC 3
Urine 1 (0,15 l)	29	107	156	139	8	2	87
Urine 2 (0,15 l)	33	112	145	143	99	3	82
Urine 3 (0,15 l)	-	114	143	136	-	1	83

SVF = sérum de veau foetal
SC = sérum de cheval

TABLEAU VI.- VARIATIONS DU TAUX D'ACTIVITE STIMULANTE DES URINES DUES AUX CONSTITUANTS DU MILIEU (75 000 CELLULES MEDULLAIRES ENSEMENCEES)

Dans la deuxième étape, on ajoute en quantités indiquées dans le tableau VII, trois substances : de la trypticase ("trypticase soy broth"), du DEAE dextran et de la L asparagine. Ces éléments sont reconnus pour favoriser la croissance des colonies.

Milieu de Eagle double force modifié	40	ml	100,45 ml
Trypticase (3 %)	10	"	
DEAE dextran (50 mg/ml)	0,15	"	
L asparagine (6,6 mg/ml)	0,3	"	
Agar à 0,72 %	50	"	

TABLEAU VII.- COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE POUR MOELLE DE SOURIS

Tous les produits sont fournis par les laboratoires Gibco, sauf le sérum de cheval que nous préparons nous-mêmes.

Le milieu est préparé le jour de son utilisation, laissé au bain-marie à 38° C jusqu'au moment de son emploi. Il peut être stocké 24 à 48 heures.

4.2.2.2. La solution d'agar

Elle se prépare comme indiquée précédemment. Seule la concentration en agar change : nous avons adopté un agar à 0,72 % qui est mélangé en parties égales au milieu de culture double concentration ; la concentration finale de l'agar est voisine de 0,30 %.

4.2.2.3. La suspension cellulaire

Il s'agit de cellules médullaires de souris. Nous employons des souris de souche consanguine C_{57} Black, âgées de 4 à 8 semaines.

On utilise pour chaque série (qui comprend 20 à 30 urines à étudier) la moelle de 2 ou 3 souris dans l'espoir d'éviter les variations

individuelles de composition de la moelle en C.F.C.-A.

La moelle rouge des tibias et des fémurs de chaque souris est prélevée aseptiquement.

Des pipettages successifs permettent d'obtenir la dissociation des amas cellulaires et une suspension homogène. Après 2 lavages et une remise en suspension, on procède à la numération des cellules nucléées.

En général, on obtient 4 à 6 millions de cellules nucléées par os prélevé.

4.2.2.4. La mise en culture (figure 2)

On ajoute la suspension cellulaire au mélange agar et milieu, en quantité suffisante pour une concentration finale de 75.10^3 cellules nucléées par ml.

0,60 ml d'urine à étudier est déposé dans un tube auquel sont ajoutés 4 ml de suspension (milieu, agar et cellules).

On ensemence avec ce mélange trois boîtes de Pétri (1,15 ml par boîte).

4.2.2.5. L'incubation

L'incubation se fait dans les mêmes conditions que celle de la moelle humaine, mais elle ne dure que 7 à 8 jours.

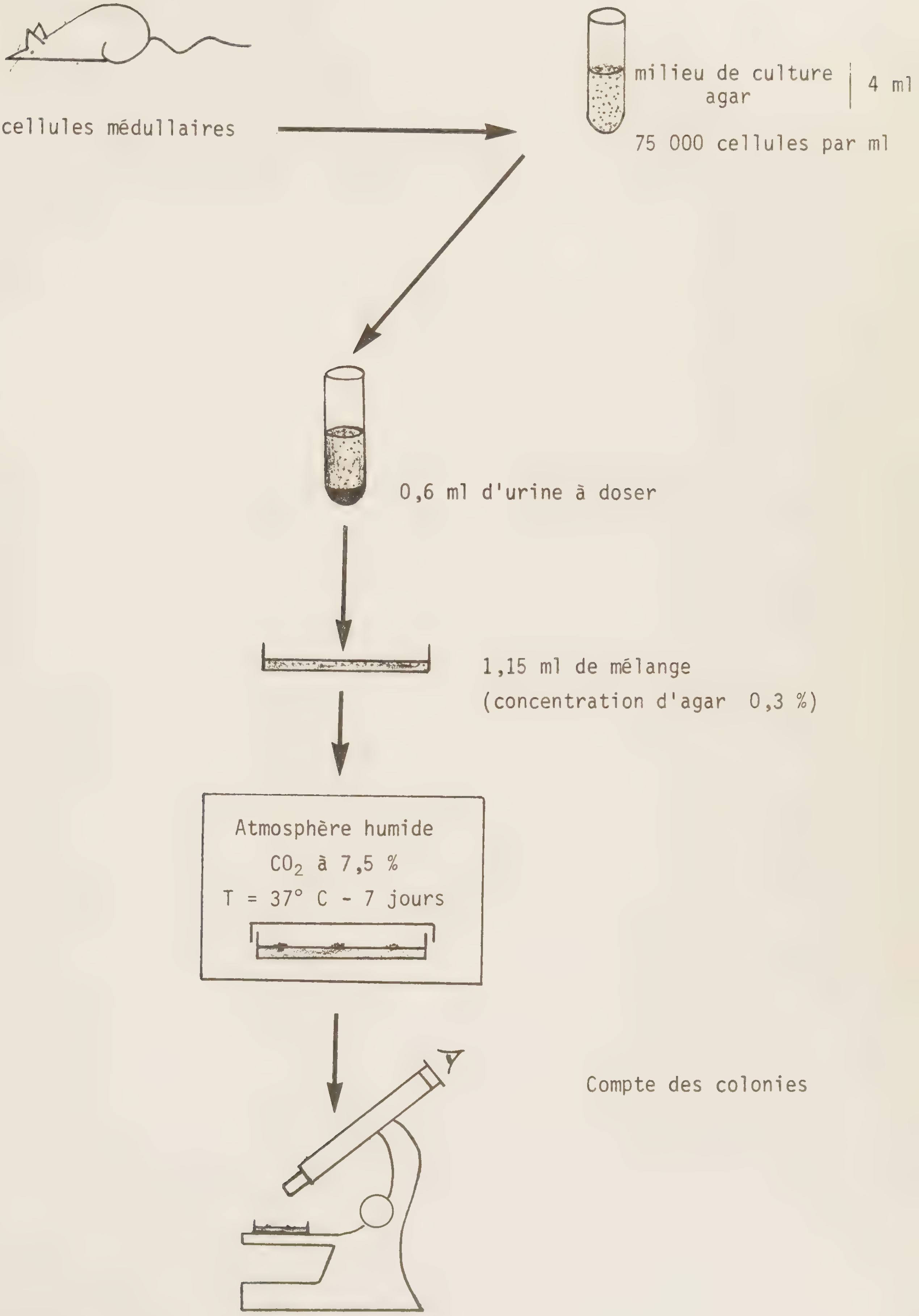
4.2.2.6. La lecture

La lecture des résultats se fait comme pour la moelle humaine. Le résultat pour chaque urine est la moyenne, faite sur 3 boîtes, du nombre de colonies.

Il est important d'avoir pour chaque expérience un C.S.F. de

FIGURE 2

TECHNIQUE DE DOSAGE DU C.S.F.



haute activité qui tient lieu de référence.

Nous rapportons le nombre de colonies données par l'urine à la moyenne des résultats obtenus avec le témoin.

En outre, pour éviter les variations dues à l'importance de la diurèse et pour pouvoir comparer l'activité C.S.F. urinaire des malades, les résultats sont rapportés à une diurèse standard de 1 l par 24 heures.

CHAPITRE 5

RESULTATS

5.1. C.S.F. URINAIRE

5.2. C.F.C.-A

5.3. RAPPORTS ENTRE LE TAUX DE C.S.F. URINAIRE ET LE NOMBRE DE C.F.C.-A

5.1. C.S.F. URINAIRE

5.1.1. SUJETS TEMOINS

Onze urines normales, provenant de 11 sujets sains (7 hommes et 4 femmes), ont été étudiées. Les recherches du C.S.F. ont été faites à plusieurs reprises ; jamais nous n'avons pu mettre en évidence d'activité stimulante dans ces urines.

Toutefois il est important de noter que certaines des urines, soumises à une adsorption sur un gel de phosphate de calcium puis à une élution, selon la technique de Stanley (169), laissent apparaître une activité stimulante très notable ; ce traitement a pour conséquence une concentration et une purification partielles du C.S.F.. Une certaine quantité de stimulant existe donc dans les urines normales, mais, ou bien elle est trop faible pour être détectée par notre technique habituelle, ou bien son activité est masquée par une substance éliminée par l'adsorption-élution.

Nous avons utilisé comme référence, une urine provenant d'un malade atteint d'une leucémie myéloïde chronique en phase évolutive dont l'activité C.S.F. est très importante. La figure 1 indique l'activité de cette urine tout au long de notre expérimentation. La moyenne du nombre de colonies formées par la stimulation de 0,15 ml d'urine sur 75 000 cellules médullaires de souris est de 72 $\pm$ 27. Les résultats ont été rapportés à ce chiffre.

Il peut paraître contestable d'utiliser comme référence un C.S.F. pathologique, mais qualitativement, le C.S.F. urinaire leucémique n'est pas différent du C.S.F. normal.

Morphologiquement, les colonies obtenues sont lâches (cliché 1), faites de cellules juxtaposées les unes aux autres, ou plus denses avec un centre foncé et une migration cellulaire périphérique (cliché 2) ou encore compactes ; plusieurs types coexistent, séparés ou non par des agrégats ou des cellules isolées (cliché 3).

La taille de ces clones est variable, mais en règle, modérée (50 à 500 cellules) ; à un plus fort grossissement au microscope inversé

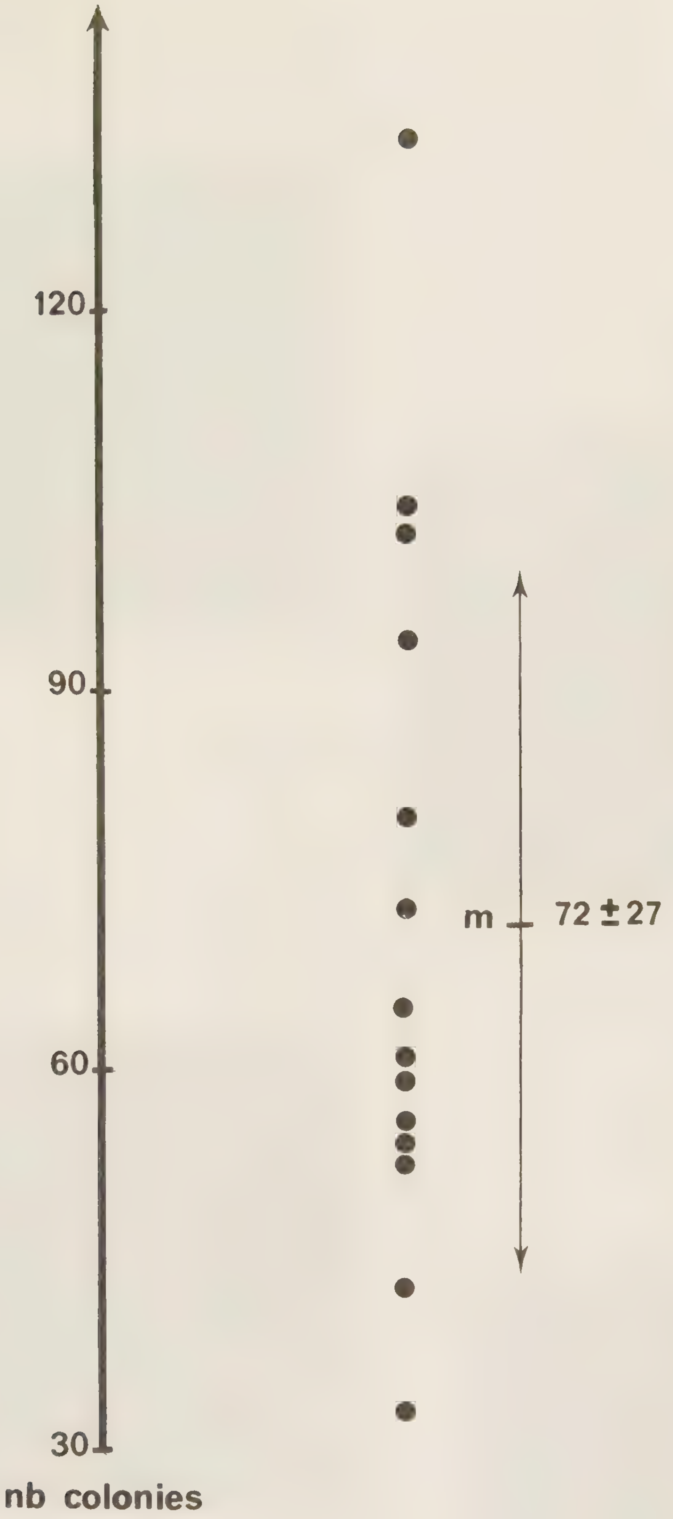
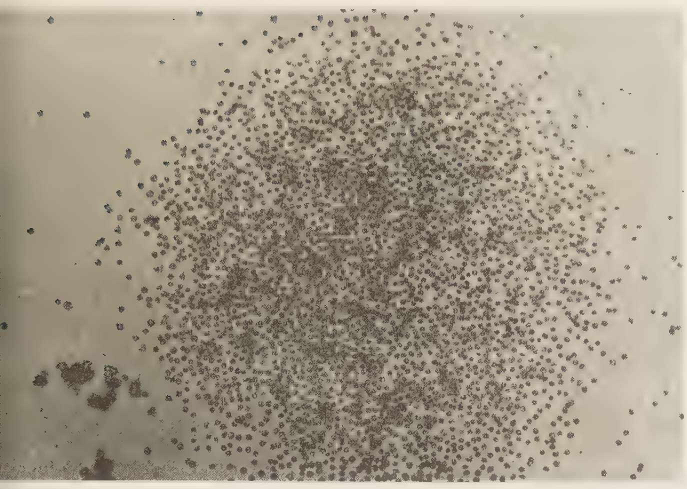
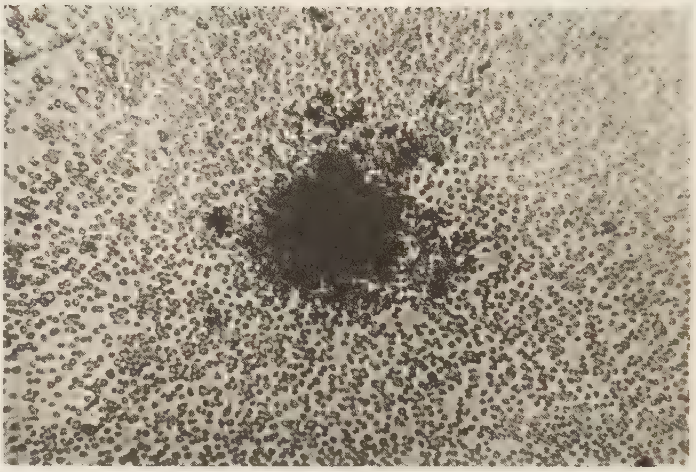


FIGURE 1 - NOMBRE DE COLONIES INDUITES PAR 0,15 ML DE L'URINE DE REFERENCE

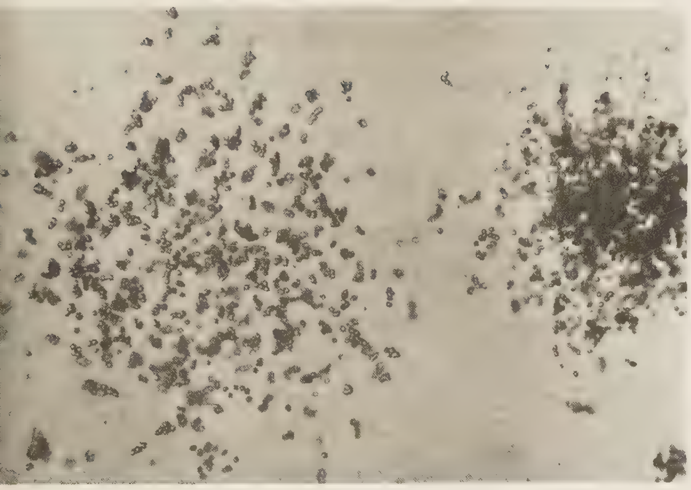
COLONIES FORMEES A PARTIR DE CELLULES MEDULLAIRES DE SOURIS



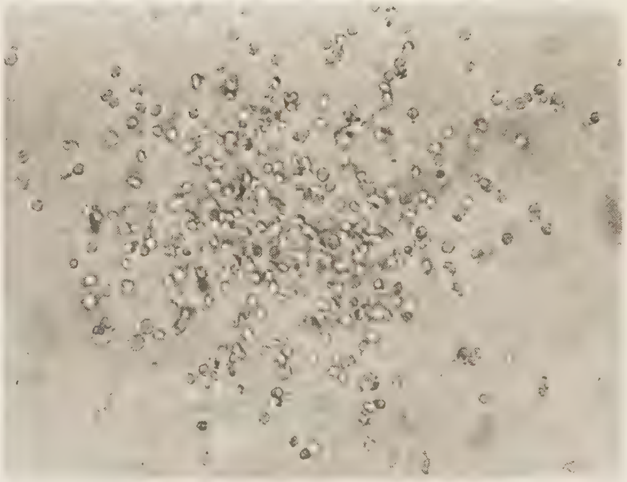
Cliché 1. x 60



Cliché 2. x 60



Cliché 3. x 60



Cliché 4. x 100

(cliché 4), la nature macrophagique des cellules examinées après 8 jours d'incubation apparaît ; elle est confirmée par la coloration au May Grunwald Giemsa (cliché 5).

5.1.2. MALADES

Les résultats seront donnés d'abord de façon globale pour toutes les leucémies ; puis nous essayerons de mettre en évidence les relations qui existent entre le taux du C.S.F. urinaire et différents facteurs ; enfin, nous distinguerons les différentes sortes de leucémies et les stades évolutifs de ces affections.

5.1.2.1. Résultats globaux

Ils sont indiqués sur la figure 2 : parallèlement sont notés les taux de C.S.F. urinaire des sujets normaux, des malades atteints de leucémie myéloïde chronique, de leucémie aiguë et des malades en état préleucémique ; le stade évolutif de la maladie n'est pas pris en considération, de même que le traitement éventuel ; chaque point représente l'activité stimulante d'une urine, calculée comme indiquée plus haut. Le même malade a pu être prélevé à plusieurs reprises, au cours du même stade évolutif ou à des stades différents.

Cela est mis en évidence dans le tableau I où sont précisés en outre, certains caractères de l'activité stimulante urinaire (une urine est dite active quand le taux de C.S.F. urinaire est supérieur ou égal à 2).

Le taux de C.S.F. urinaire est très variable au cours des leucémies ; cependant, il faut noter que sur 58 urines de L.M.C. étudiées, 57 % sont actives ; sur 56 urines de L.A., 46 %. La figure 3 donne le diagramme de la répartition des activités C.S.F.

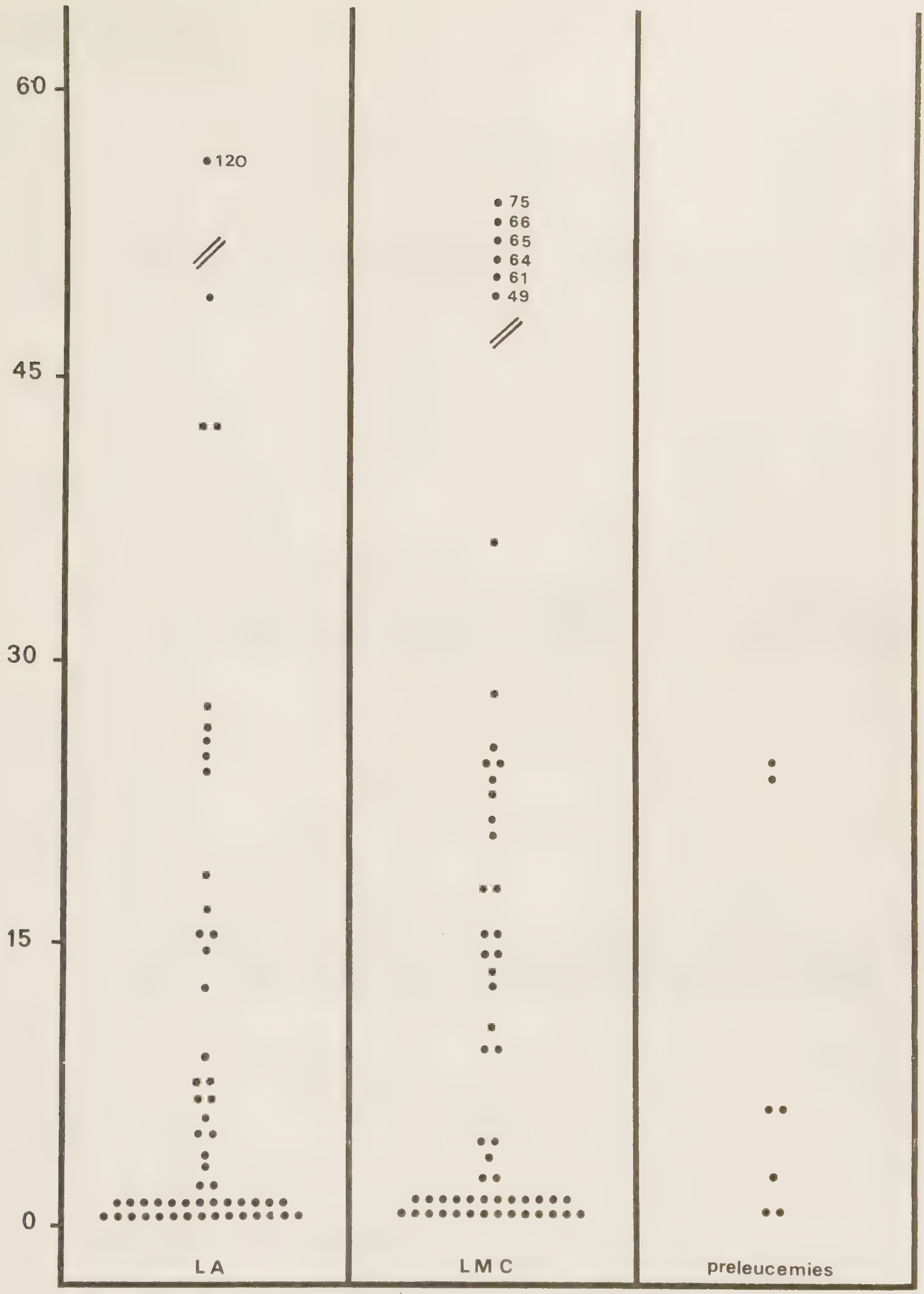


FIGURE 2. - ACTIVITE STIMULANTE URINAIRE DES SUJETS LEUCEMIQUES

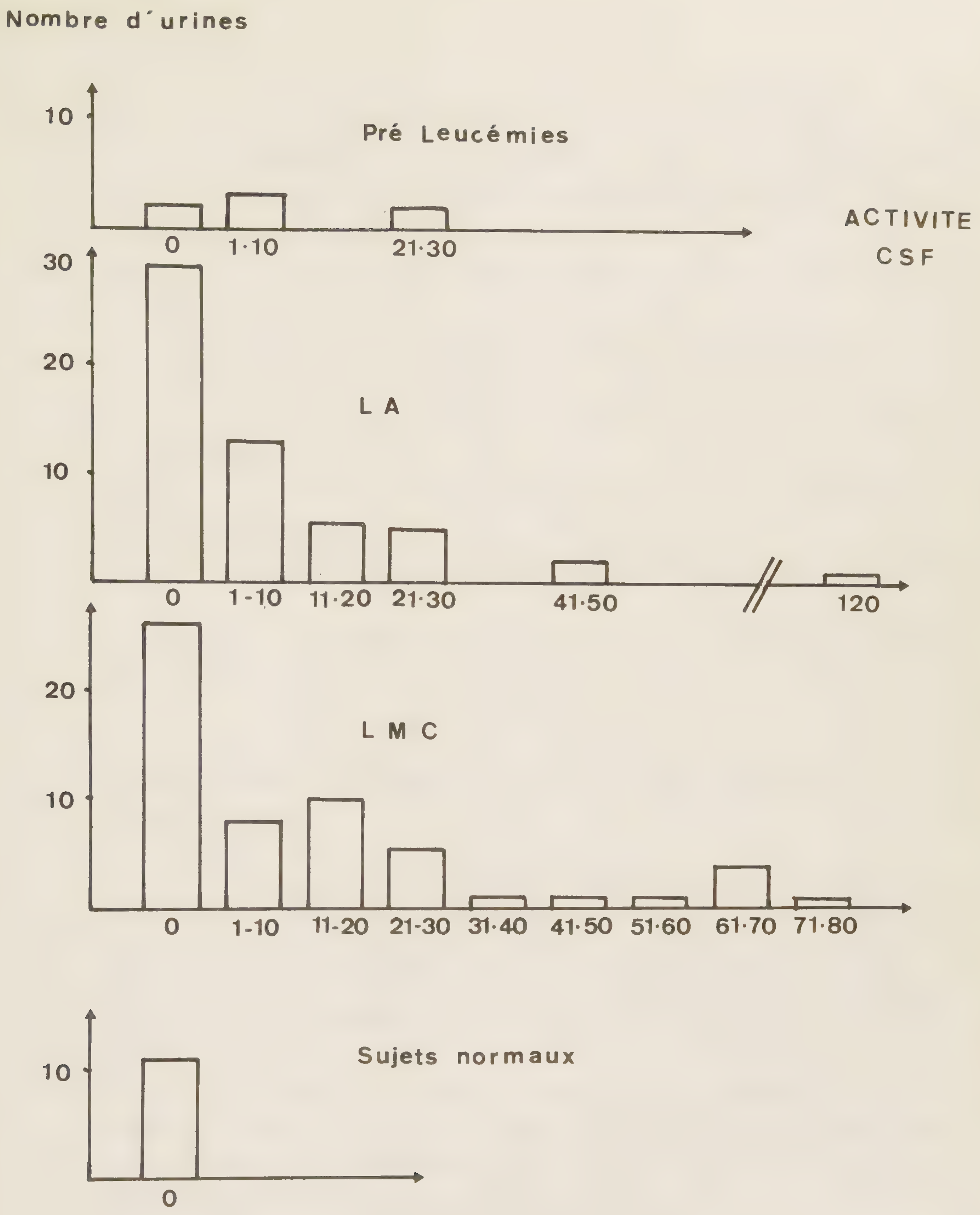


FIGURE 3. - DIAGRAMME DE LA REPARTITION DE L'ACTIVITE C.S.F. DES URINES DES SUJETS ETUDIES

DIAGNOSTIC	TEMOINS	L.M.C.	L.A.	PRELEUCEMIES
Nombre de sujets étudiés	11	22	26	3
Nombre d'urines étudiées	11	58	56	7
Pourcentage d'urines actives	0	57	46	71
Amplitude de l'activité stimulante	0	2 à 75	1 à 120	2 à 26
Moyenne générale	0	14	8	9

TABLEAU I.- REPARTITION DES MALADES ETUDIES ET TAUX DU C.S.F. URINAIRE

5.1.2.2. Relations entre le C.S.F. urinaire et différents facteurs

Nous avons essayé d'établir l'existence de relations entre le taux de C.S.F. urinaire et le taux sanguin d'acide urique ou la leucocytose sanguine (polynucléose neutrophile et monocytose). Aucun rapport entre ces facteurs n'a pu être démontré. De même le traitement transfusionnel et la chimiothérapie n'influencent pas le taux de C.S.F. urinaire.

Par contre, une relation apparaît entre l'activité C.S.F. urinaire et l'état infectieux des malades. Pour cela, nous nous sommes basés essentiellement sur l'existence d'une température supérieure à 38° C : chez les sujets fébriles, la proportion d'urines actives est beaucoup plus élevée que chez les sujets apyrétiques (tableau II).

DIAGNOSTIC		LEUCEMIES	L.M.C.	L.A.	PRELEUCEMIES
NOMBRE D'URINES ETUDIEES		114	58	56	7
en période non fébrile	nombre total	61	35	26	5
	Pourcentage d'urines actives	41	40	32	60
	moyenne de l'activité	4	5	2	2
en période fébrile	nombre total	53	23	30	2
	pourcentage d'urines actives	69	78	63	100
	moyenne de l'activité	19	27	13	25

TABLEAU II.- INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR L'EXCRETION URINAIRE DU C.S.F. CHEZ LES LEUCEMIQUES

5.1.2.3. Type et stade clinique

Les leucémies aiguës

Elles ont été séparées d'abord selon leur type cytologique : leucémie aiguë lymphoblastique d'une part, leucémie aiguë myéloblastique et promyélocytaire d'autre part. Une leucémie aiguë monoblastique est ajoutée.

Selon l'évolution, on distingue 3 stades :

- stade du diagnostic et de la rechute, c'est-à-dire leucémie aiguë en poussée ;
- stade de l'aplasie post thérapeutique ;

- stade de la rémission complète.

Les critères de séparation de ces différents stades sont cliniques et hématologiques.

Le stade 1 est caractérisé par une prolifération blastique médullaire et sanguine;

Le stade 2 par une pancytopénie périphérique, une moelle déserte sans leucoblastes décelables;

Le stade 3 par un état clinique et hématologique normaux et stables.

Il n'a pas été fait systématiquement de ponctions d'organes (en dehors des ponctions lombaires et médullaires) pour s'assurer de l'absence de leucoblastes.

Sur les tableaux III et IV, sont portés les résultats du dosage du C.S.F. urinaire dans les différents types de leucémies aiguës étudiées et selon les stades évolutifs.

On peut noter que le pourcentage d'urines actives dans les L.A.M. est plus élevé que dans les L.A.L.

Le nombre de sujets étudiés en aplasie et en rémission est trop faible pour tirer des conclusions sur les variations du taux du C.S.F. ou de la proportion d'urines actives au cours des différentes phases de la maladie ; il semble que, pour les L.A.M., la proportion d'urines actives est plus grande chez les malades en poussée que chez les malades en rémission.

Au cours du stade 1, sur 17 urines provenant de sujets fébriles, 14 sont actives ; sur 9 urines de sujets apyrétiques, 6 ont un taux de C.S.F. élevé.

Les leucémies myéloïdes chroniques

Les résultats d'ensemble concernant cette affection ont déjà été énoncés plus haut. Selon le stade évolutif, plusieurs catégories ont été déterminées :

DIAGNOSTIC	L.A.	L.A.L.	L.A.M.	L.A. Pr.M	L.A. Mon
Nombre de sujets étudiés	26	4	20	1	1
Nombre d'urines étudiées	56	17	37	1	1
Pourcentage d'urines actives	46	29	57	100	0
Amplitude de l'activité	1 à 120	2 à 27	1 à 120	25	0
Moyenne	8	3	11		0

ABLEAU III.- ACTIVITE STIMULANTE URINAIRE DANS LES DIFFERENTES LEUCEMIES AIGUES

STADES CLINIQUES	L.A.L.			L.A.M.		
	poussée	aplasie	rémission	poussée	aplasie	rémission
Nombre de sujets étudiés	3	2	2	18	3	4
Nombre d'urines étudiées	9	4	4	26	5	7
Pourcentage d'urines actives	33	25	25	77	20	14
Amplitude de l'activité	2 à 7	27	16	1 à 120	14	26
Moyenne	1	6	4	14	2	3

TABLEAU IV.- ACTIVITE STIMULANTE URINAIRE EN FONCTION DU STADE EVOLUTIF

- L.M.C. au moment du diagnostic (période de début clinique de la maladie) ;

- L.M.C. compliquée : il s'agit ici soit d'aplasie médullaire post thérapeutique (après une poussée typique de L.M.C. ou une "acutisation"), soit de rechute après rémission, soit d'un syndrome que l'on pourrait qualifier de "pré-acutisation" (caractérisé par des modifications de l'état clinique, une augmentation des P.A.L., des basophiles, des myéloblastes, une diminution du chiffre des plaquettes) ;

- des L.M.C. en phase aiguë (ou "acutisation") définies essentiellement par une myéloblastose médullaire supérieure à 30 %.

Dans le tableau V sont inscrits les résultats obtenus selon les stades cliniques. La comparaison des moyennes montre que en période compliquée, l'activité C.S.F. urinaire est plus importante que lors de la première poussée. D'autre part, le pourcentage d'urines actives est plus élevé dans les L.M.C. compliquées.

STADES CLINIQUES	PREMIERE POUSSEE	PERIODE COMPLIQUEE	PHASE AIGUE
Nombre de sujets étudiés	8 (dont 2 Spl.M.)	13	4
Nombre d'urines étudiées	19 (dont 2 Spl.M.)	33	6
Pourcentage d'urines actives	37	63	66
Amplitude de l'activité	2 à 17 (14 et 25)	4 à 75	4 à 20
Moyenne avec les Spl.M.	4		
Moyenne sans les Spl.M.	2	21	8

TABLEAU V.- TAUX DU C.S.F. URINAIRE DANS LES L.M.C.

Au cours de la période compliquée, sur 21 urines provenant de malades fébriles, 19 ont un taux de C.S.F. élevé. Par contre, sur 12 malades non fébriles, 2 seulement ont une urine active.

5.1.2.4. **Plusieurs études séquentielles** ont été faites ; aussi bien dans les leucémies aiguës que les leucémies myéloïdes chroniques, aucun profil général de l'évolution du taux urinaire de C.S.F. en fonction du traitement et de l'état clinique, n'apparaît.

5.2. C.F.C.-A

5.2.1. ETUDE DES CELLULES PROGENITRICES DE LA GRANULOPOIESE CHEZ LES SUJETS NORMAUX

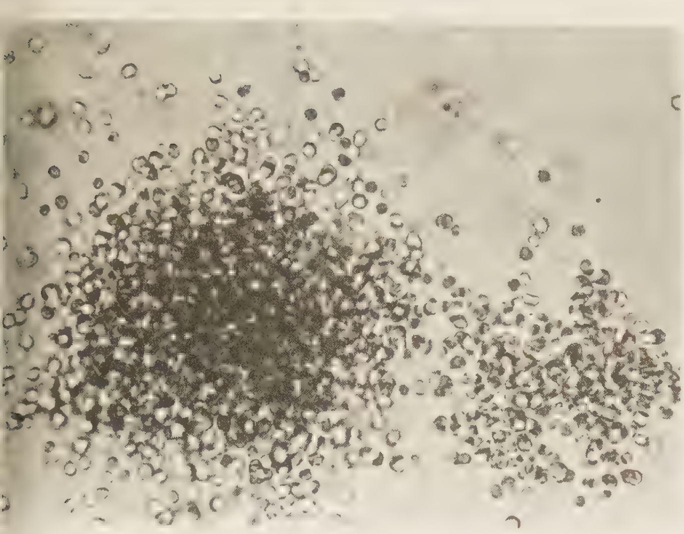
Elle a été faite à partir de moelle hématopoïétique de 37 témoins.

La figure 4 donne la répartition des résultats obtenus lors de la mise en culture de ces moelles : il s'agit du nombre de colonies développées pour 2.10^5 cellules nucléées ensemencées.

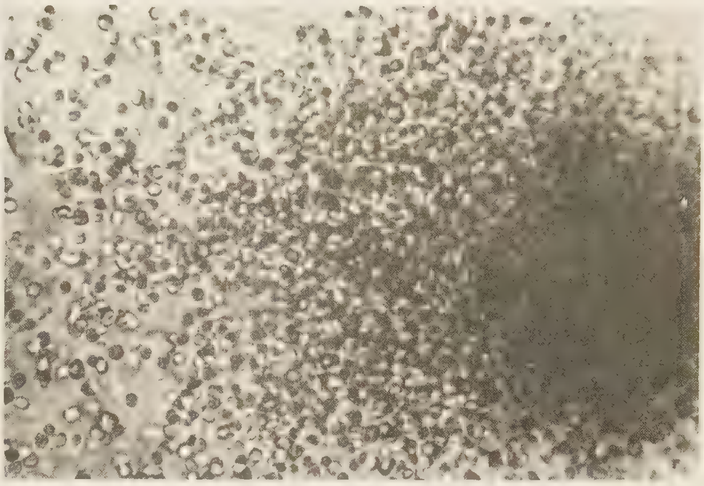
La dispersion est assez importante, mais on note un regroupement des chiffres de 50 à 90 colonies ; les chiffres extrêmes sont 10 et 231 ; la moyenne est de 80, l'écart type de 49.

La taille des colonies varie de 50 cellules (nombre de cellule arbitrairement choisi comme limite inférieure de la taille d'une colonie) à, environ, 3 000. Dans une même boîte, si les colonies ont le plus souvent le même aspect : colonies denses (cliché n° 6), bien séparées les unes des autres, leur taille n'est pas identique et entre de grosses colonies se trouvent quelques agrégats. En cas de prolifération intense, les limites des clones ne sont plus aussi nettes, et ils peuvent confluer.

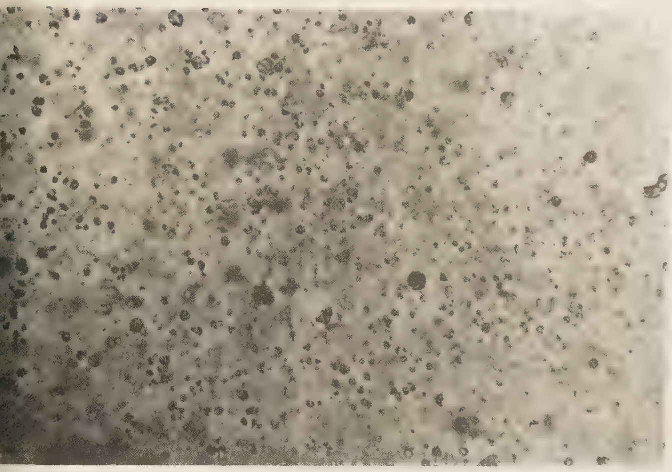
Le cliché n° 7 montre la progression vers la périphérie de la prolifération cellulaire.



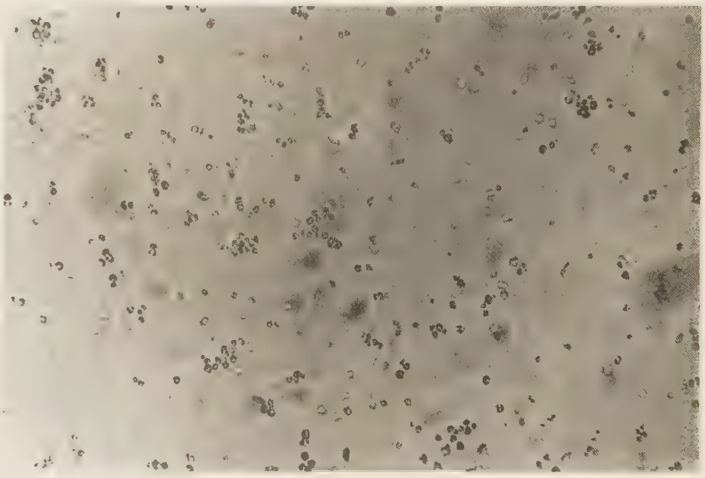
Cliché 6. x 100
sujet normal



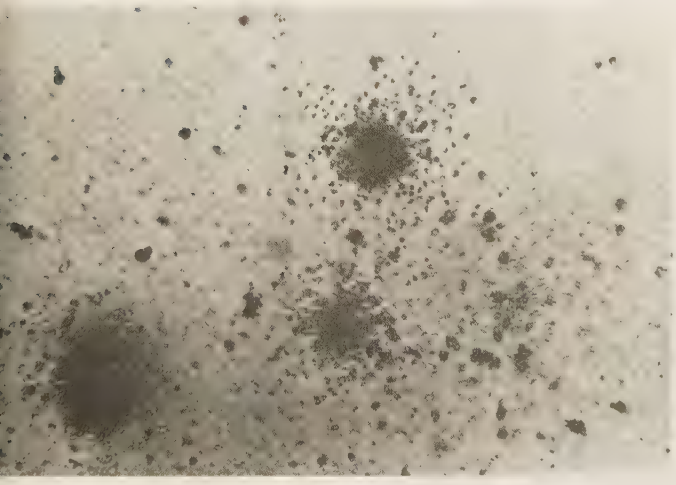
Cliché 7. x 100
sujet normal



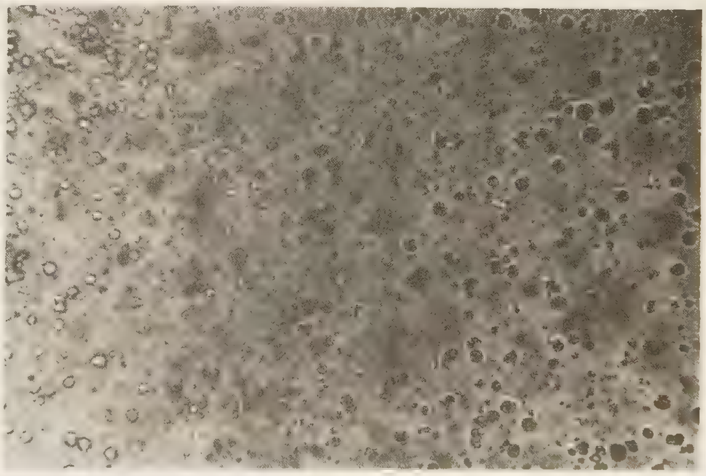
Cliché 10. x 100
L.A. (stimulant +)



Cliché 11. x 100
L.A. (stimulant —)



Cliché 12. x 100
L.M.C.



Cliché 13. x 100
L.M.C.

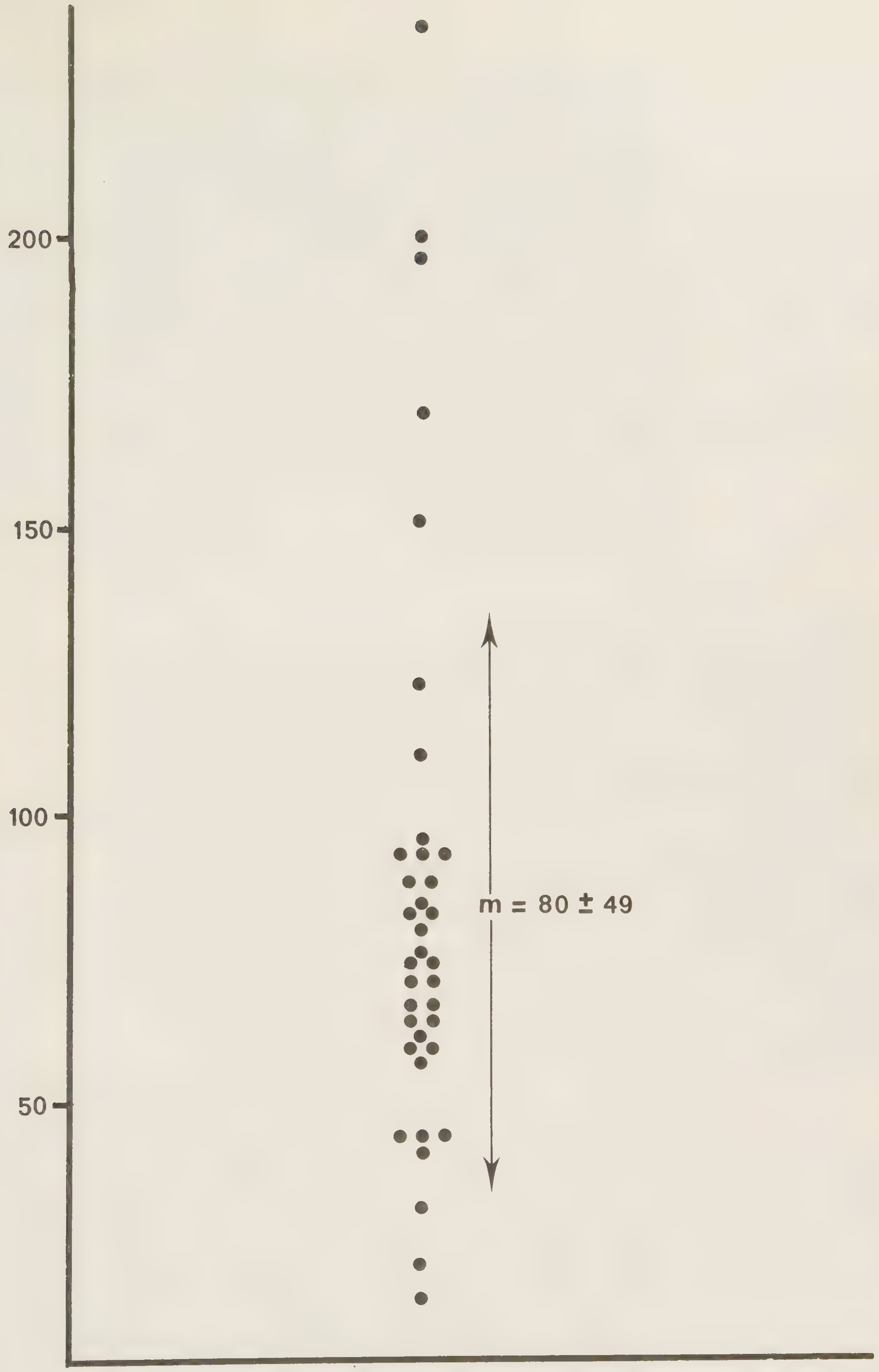


FIGURE 4.- NOMBRE DE COLONIES POUR 2.10^5 CELLULES ENSEMENCÉES

(MOELLE TEMOIN)

D'un point de vue cytologique, au moment de la lecture (14ème jour environ), les clones sont composés de cellules granuleuses pour la plupart matures ; des cellules macrophagiques, le plus souvent en nombre peu important (cliché 8), peuvent coexister ; plus tôt dans l'incubation, tous les éléments de la lignée myéloïde sont présents (cliché 9). Parfois les colonies sont mixtes.

En l'absence de couche nutritive, c'est-à-dire de stimulant, aucune colonie ne se développe pour la concentration cellulaire habituellement utilisée (2.10^5 par boîte).

5.2.2. LES LEUCEMIES

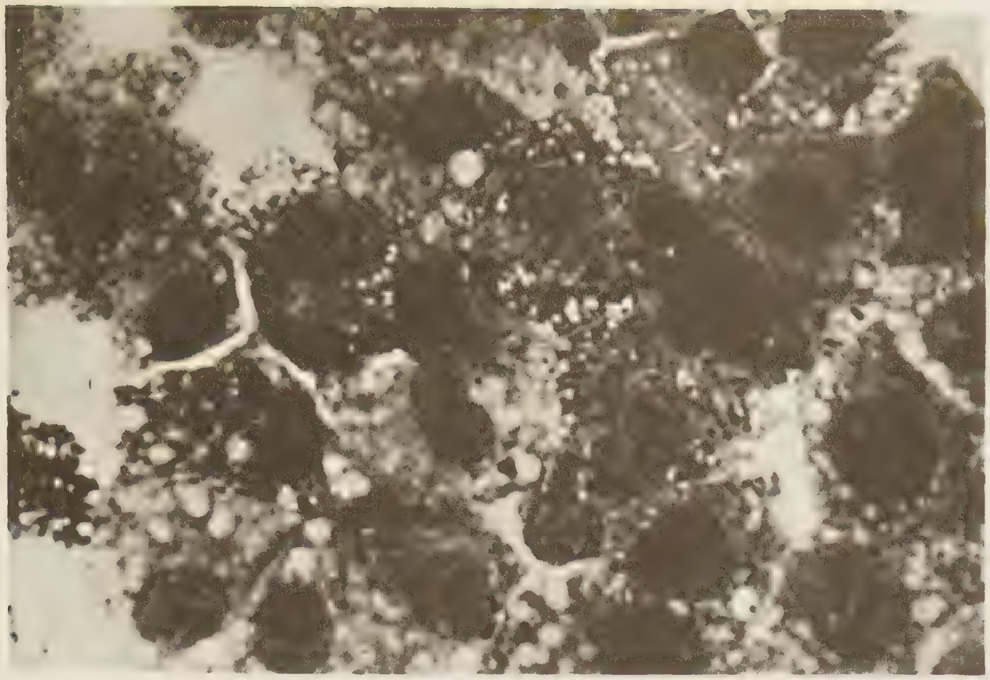
Nous les détaillerons pour chaque groupe d'affection étudié : les leucémies aiguës, les leucémies myéloïdes chroniques et les états préleucémiques.

Le tableau VI indique le nombre de malades de chaque catégorie, le nombre de moelles et de sangs mis en culture et le nombre moyen de colonies obtenues.

Dans toutes les figures, chaque point représente le résultat d'une culture de cellules sanguines ou médullaires (moyenne de 5 boîtes) pour 2.10^5 cellules ensemencées et stimulées par une quantité optimale de C.S.F. (1.10^6 leucocytes).

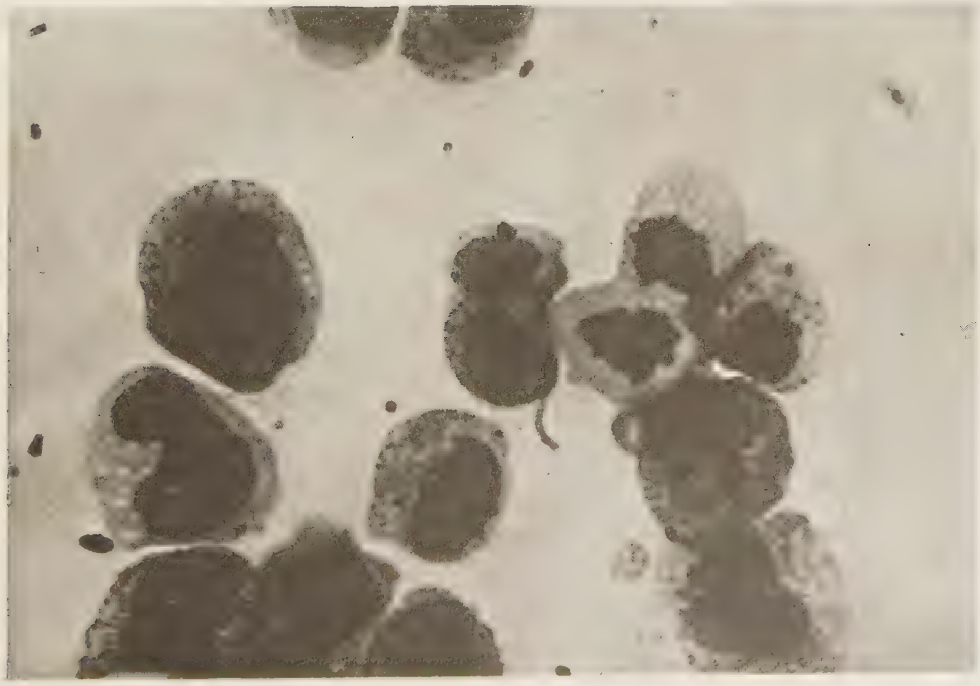
5.2.2.1. Les leucémies aiguës

Les résultats sont rapportés de façon globale dans les figures 5 pour les cultures de moelle et 6 pour les cultures de sang. Aucun compte n'a été tenu du type cytologique ou du stade évolutif de l'affection. La zone hachurée représente la moyenne du nombre de C.F.C.-A pour 2.10^5 cellules médullaires témoins, plus ou moins l'écart type. Les 2/3 des points sont en dehors de cette zone, et une bonne partie d'entre eux, situés à la partie supérieure de la figure, correspond à un aspect des cultures



Cliché 5. x 1000
souris

Cliché 8. x 1000
homme normal



Cliché 9. x 1000
homme normal

TYPE DE LEUCEMIE	NOMBRE DE MALADES ETUDIES	ETUDE DES CELLULES MEDULLAIRES			ETUDE DES CELLULES SANGUINES		
		Nombre de moelles étudiées	Nombre de colonies Moyenne	Nombres extrêmes	Nombre de sangs étudiés	Nombre de colonies Moyenne	Nombres extrêmes
L.A.	23	38	30	0 - 106	25	6	0 - 35
L.M.C.	17	16	225	0 - 1 600	18	253	0 - 2000
Préleucémies	3	8	101	1 - 443	2	0	0

TABLEAU VI.- REPARTITION ET RESULTATS GLOBAUX DES CULTURES DE MOELLE ET DE SANG LEUCEMIQUES

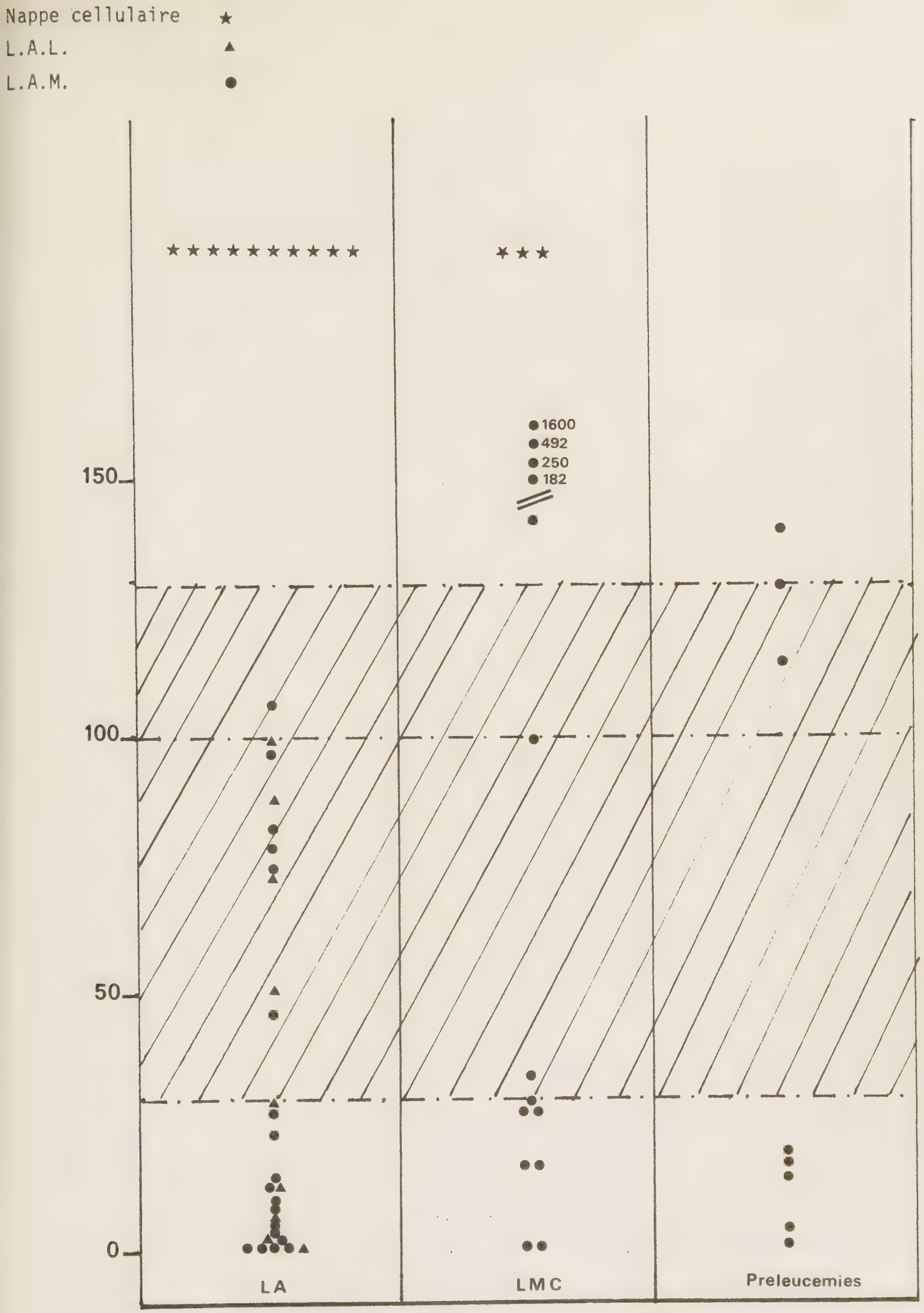


FIGURE 5.- NOMBRE DE COLONIES POUR 2.10^5 CELLULES ENSEMENCEES

(MOELLE LEUCEMIQUE)

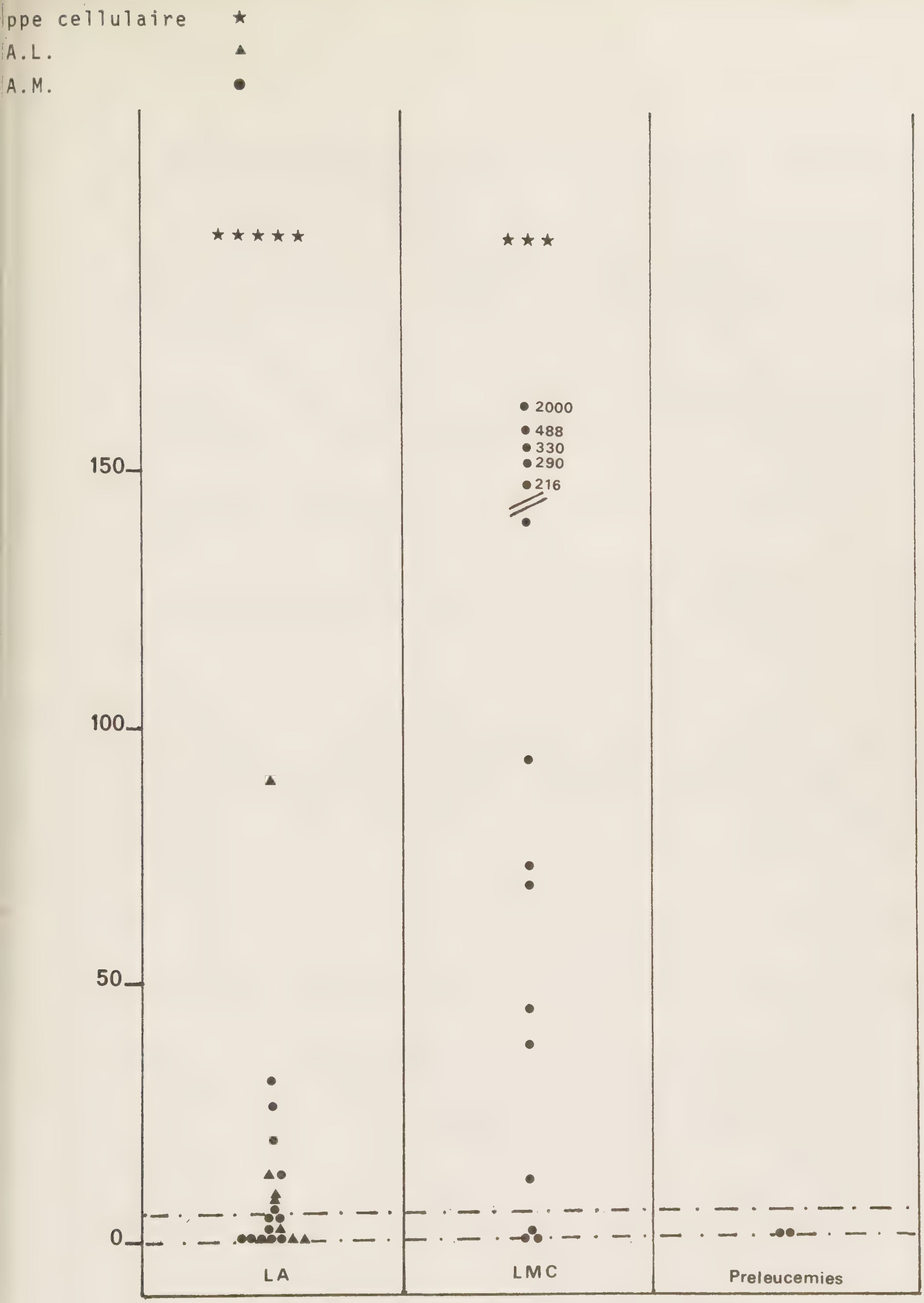


FIGURE 6.- NOMBRE DE COLONIES POUR 2.10^5 CELLULES ENSEMENCEES

(SANG LEUCEMIQUE)

particulier aux leucémies : la nappe cellulaire -nous la décrirons plus en détail ultérieurement-.

Parmi les leucémies aiguës, ont été étudiées 3 leucémies aiguës lymphoblastiques (L.A.L.), 19 leucémies aiguës myéloblastiques (L.A.M.) et une leucémie aiguë promyélocytaire que nous inclurons dans le groupe précédent.

Selon l'évolution, on distingue les trois phases décrites précédemment : stade 1 (1ère poussée ou rechute) ; stade 2 (aplasie post thérapeutique) ; stade 3 (rémission).

Leucémies aiguës lymphoblastiques

La répartition des malades selon leur stade évolutif est indiqué dans le tableau VII, ainsi que le nombre de clones obtenus.

STADE CLINIQUE	NOMBRE DE MALADES	ETUDE DES CELLULES MEDULLAIRES		ETUDE DES CELLULES SANGUINES	
		Nombre de moelles étudiées	Nombre moyen de colonies	Nombre de sangs étudiés	Nombre moyen de colonies
1	1	2	7	1	0
2	3	2	14	2	0
3	3	5	64	3	8

TABLEAU VII.- REPARTITION ET RESULTATS DES CULTURES DE SANG ET DE MOELLE DE L.A.L.

L'état hématologique des malades, au moment de l'étude, est précisé dans les tableaux VIII et IX, de même que le nombre de clones obtenus pour chaque culture et leur taille.

La richesse médullaire est exprimée en croix : ++++ correspond à une moelle très riche, +++ à une moelle riche, ++ à une moelle de richesse moyenne, + à une moelle pauvre, $\pm$ à une moelle déserte.

Nombre et taille des colonies : lors de la culture de cellules médullaires, le nombre des clones varie de 1 à 99 ; mais il est remarquable que la formation de colonie est quantitativement normale pour toutes les moelles prélevées en période de rémission -à l'exception d'une seule, mais la rémission n'était pas complète-.

Les clones issus de cellules sanguines sont peu nombreux, en règle, dans les limites de la normale (0 à 5).

La taille des colonies ne montre pas de particularités ; à un nombre faible de clones correspond le plus souvent une dimension restreinte.

Morphologie et cytologie : quelque soit le stade évolutif, l'aspect macroscopique des clones ne diffère pas de ce qui est observé lors de culture de moelle ou de sang normaux ; les colonies compactes ont un centre dense, une périphérie peu large composée de cellules moins serrées ; elles sont bien séparées entre elles.

L'aspect cytologique est identique à ce qui a été décrit plus haut pour la granulopoïèse *in vitro* humaine.

Etude séquentielle : la figure 7 schématise l'évolution dans le temps d'un malade atteint de L.A.L. : hospitalisé fin mai en pleine poussée de sa leucose, il est mis en rémission partielle 15 jours après, et en rémission complète à la mi juillet ; cette rémission dure jusqu'au début décembre, date de la rechute. Le nombre de C.F.C. médullaire très bas au début, augmente pour se situer à 99 et 88 colonies au cours de la rémission complète et s'effondrer de nouveau lors de la rechute.

MALADE N°	DATE	STADE CLINIQUE	CELLULARITE	Lb (%)	COMPARTIMENT PROLIFERATIF GRANULEUX (%)	NOMBRE DE COLONIES	TAILLE DES COLONIES
26	30.05	1	++++	98	0	2	50 - 100
	6.06	2	±	65	4	1	200
	13.06	3*	+	12	12	6	50 - 500
	10.07	3	+	0	19	99	50 - 1 000
	19.09	3	+	0	25	88	50 - 3 000
	13.12	1	++	98	0	12	50 - 500
25	13.12	2	+	60	2	28	50 - 200
	10.12	3	++	0	20	50	50 - 1 000
39	26.02	3	++	0	5	79	50 - 1 500

* rémission partielle

TABLEAU VIII.- ETAT HEMATOLOGIQUE MEDULLAIRE DES L.A.L. ETUDIEES

MALADE N°	DATE	STADE CLINIQUE	LEUCOCYTOSE par mm^3	Lb (%)	NOMBRE DE COLONIES	TAILLE DES COLONIES
26	30.05	1	54 000	88	0	-
	6.06	2	900	12	1	100
	10.07	3	9 800	0	6	50 - 1 000
	18.09	3	5 800	0	12	50 - 800
25	20.12	3	4 800	0	8	50 - 200
39	10.10	2	600	10	0	-

TABLEAU IX.- ETAT HEMATOLOGIQUE SANGUIN DES L.A.L. ETUDIEES

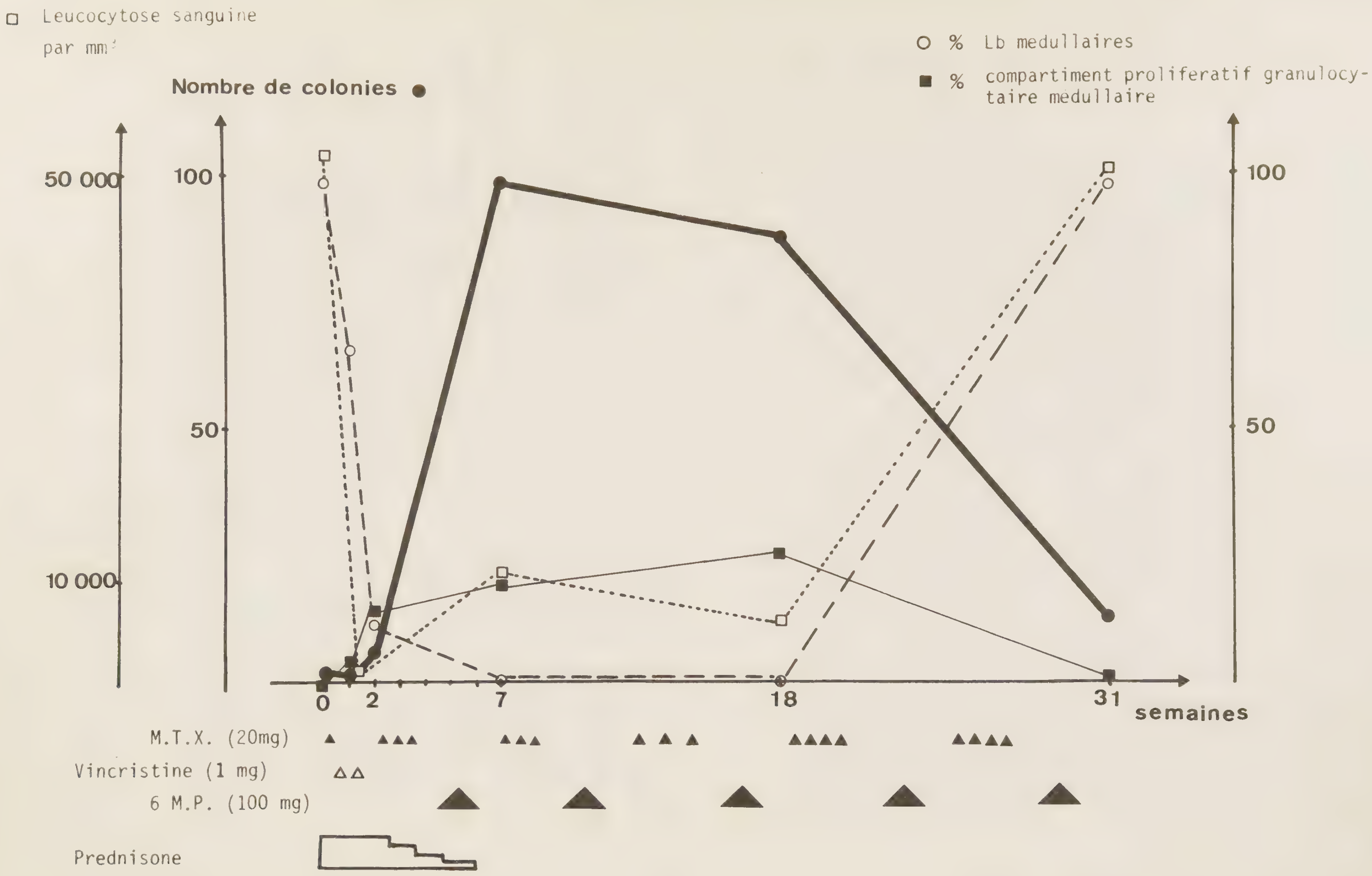


FIGURE 7.- ETUDE SEQUENTIELLE D'UN MALADE ATTEINT DE L.A.L. (N° 26)

Les leucémies aiguës myéloblastiques

La formation des colonies dans ce type d'affection est très particulière ; nous en décrirons d'abord les aspects morphologiques et nous préciserons ensuite les données quantitatives.

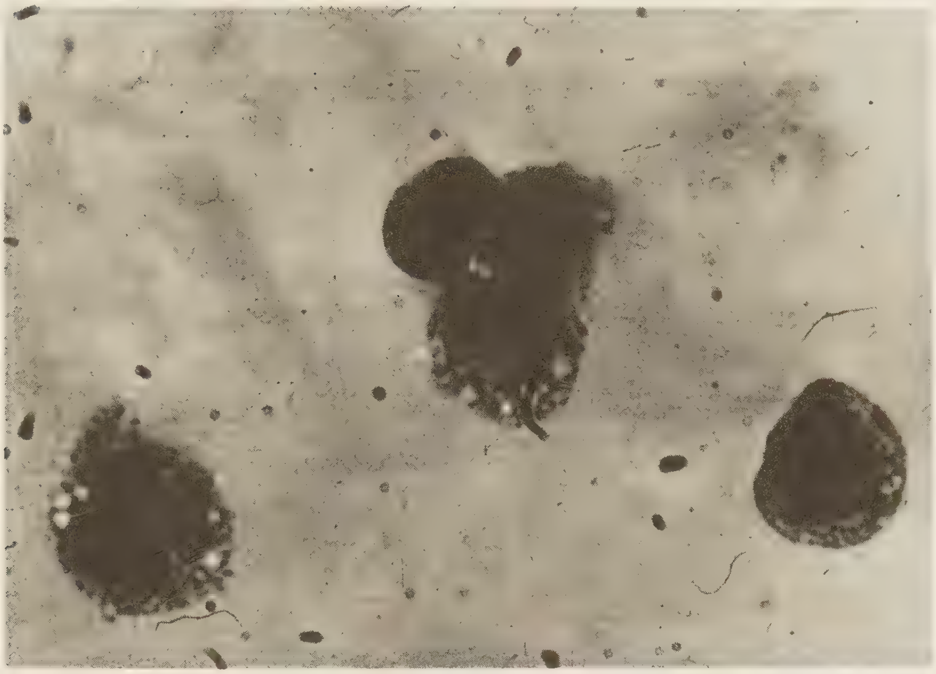
Morphologie et cytologie : contrairement aux cultures de cellules médullaires normales ou de L.A.L., plusieurs aspects sont mis en évidence lorsque des cellules hématopoïétiques de L.A.M. sont ensemencées et stimulées.

- Aucune colonie, ni aucun agrégat (supérieur à 10 cellules) ne s'est formé ; dans la boîte de Pétri, les cellules ensemencées persistent, mais elles n'ont pas proliféré. Il s'agit de granulocytes ou de macrophages. Elles se sont donc différenciées.

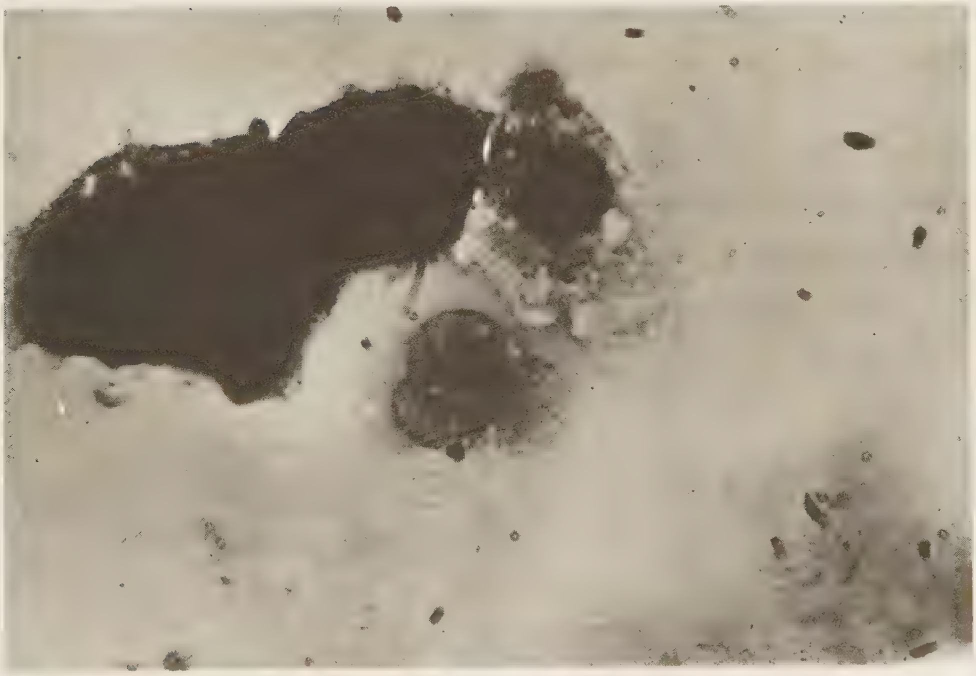
- Des clones se sont développés ; leur apparence est normale : colonies compactes de taille moyenne (500 à 1 000 cellules) ; cytologiquement, elles sont composées en majorité de cellules granuleuses. Il s'agit d'une prolifération et d'une différenciation normale.

- L'aspect le plus particulier est l'apparition d'une nappe cellulaire, où les cellules sont juxtaposées de manière plus ou moins régulière, souvent par petits groupes à la surface et assez souvent dans la couche supérieure de l'agar. Leur densité varie, allant de la nappe assez lâche (notée 1 croix dans les tableaux suivants) à des nappes denses aux cellules serrées (à 2 croix correspond une densité moyenne, à 3 croix une densité importante) (cliché 10, p 95). Ces nappes sont soit uniques, soit associées à des agrégats ou à des colonies véritables de morphologie habituelle. Cytologiquement, les cellules qui les composent sont le plus souvent des macrophages (cliché 14), quelquefois des cellules granuleuses (myélocytes et polynucléaires) ou les deux.

Dans la plupart des cas, en l'absence de stimulation, il n'y a pas de prolifération. Cependant, on peut observer, dans certains cas, l'existence de petits agrégats de 3 à 10 cellules (cliché 11) et même quel-



Cliché 14. x 1000. L.A.



Cliché 15. x 1000. L.M.C.

quefois de petites colonies lâches de 50 cellules. Cette prolifération spontanée montre une certaine autonomie vis à vis du stimulant . La pousse est cependant encore accrue en présence de C.S.F. (cliché **10**, p 95).

Nombre et taille des colonies : 20 malades atteints de L.A.M. ont été étudiés ; leur répartition selon le stade clinique et les résultats quantitatifs d'ensemble sont notés dans le tableau X ; les données hématologiques dans les tableaux XI et XII. Les aspects de nappe cellulaire associés ou non à des colonies ont été séparés.

L'existence de nappe cellulaire est caractéristique du stade évolutif 1, c'est-à-dire des poussées leucémiques (1ère poussée ou rechute). On peut remarquer que ce sont les leucémies hyperleucocytaires qui donnent une pousse en nappe de densité importante.

L'installation de la rémission entraîne une normalisation du nombre des colonies.

Les résultats des cultures de cellules sanguines de L.A.M. peuvent être répartis en deux groupes :

Un groupe où les colonies sont remplacées par une nappe cellulaire ; 3 cas sur les 5 associent à la nappe des agrégats ;

Le deuxième où le nombre de clones varie de 0 à 35 ; 9 cas sur 14 ont un nombre de C.F.C. *in vitro* normal.

Tous deux correspondent au stade évolutif 1 et 2. Aucun malade en rémission n'a été l'objet d'une culture de cellules sanguines.

Un certain parallèlisme est noté entre le nombre de C.F.C.-A médullaires et sanguines : le type de pousse est en général analogue ; cependant, 3 malades forment,en culture de cellules médullaires, une nappe cellulaire, et en culture de sang donnent 0,4 et 12 colonies.

La taille des clones est variable, mais le plus souvent inférieure à la moyenne normale.

Etudes séquentielles : un exemple en est donné sur la figure 8. On retrouve le même phénomène précédemment noté dans les L.A.L. : formation de colonies pratiquement nulle en poussée, et normalisation progres-

STADE CLINIQUE	NOMBRE DE MALADES	ETUDES DE CELLULES MEDULLAIRES			ETUDES CELLULES SANGUINES		
		Nombre de moelles étudiées	Nombre moyen de colonies (valeurs extrêmes)	Nombre de moelles donnant des nappes	Nombre de sangs étudiés	Nombre moyen de colonies (valeurs extrêmes)	Nombre de sangs donnant des nappes
1	17	23	12 (0 à 40)	10	17	6 (0 à 35)	5
2	2	1	0	0	2	15 (0 . 30)	0
3	4	5	77 (46 à 106)	0	0	-	-

TABLEAU X.- REPARTITION ET RESULTATS DES CULTURES DE SANG ET DE MOELLE DE L.A.M.

N°	DATE	STADE CLINIQUE	CELLULARITE	Mb (%)	PM et My (%)	COLONIES Nombre	taille	nappe
28	24.08	1	++++	90	4	-	-	+++
32	19.09	1	++	82	3	2	50 - 3000	-
33	30.05	1	+++	90	0,5	2	200	-
	6.06	2	++	74,5	0	0	-	-
34	2.10	1	+	43	11,5	27	50 - 1500	-
35	10.11	1	++++	92	0	-	-	++ (+ agr.[1])
36	13.02	1	+	50	0	13	50 - 500	-
38	21.02	3	++	1,5	11	46	50 - 2000	-
40	4.10	3	++	4	22	72	50 - 1000	-
42	21.02	1	+++	94	0	0	-	-
	7.03	1	++++	92	0	22	50 - 200	-
	22.03	3	++	0	28	68	50 - 1500	-
	11.04	3	++	0	21,5	106	50 - 1000	-
44	6.07	1	+	25	11	5	50 - 500	-
45	4.10	1	+	47	3,5	9	50 - 500	-
46	20.06	1	+++	82	1	0	0	+++
49	28.03	1	+++	90	0	0	0	-
	13.06	1	+	10	4	0	0	-
51	30.05	1	++++	65	16	0	0	+++
	20.06	1	+++	61	21,5	0	0	+++
	25.09	1	++++	32	22	12	100 - 500	++
	6.11	1	++	61	3,5	40	100 - 500	++
	12.04	1	++++	75	3	0	0	+
52	9.01	1	++++	33	11,5	0	0	+ (+ agr.)
53	22.02	1	+	78	0	0	0	-
30	3.05	1	+++	90	0	12	500 - 1200	-
48	8.03	1	++++	85	2	8	50 - 100	-
47	13.02	3	+++	1,5	18	96	50 - 1000	-
23	9.04	1	+++	91	1	0	0	+++ (+ agr.)

[1] agr. = agrégats

TABLEAU XI.- ETAT HEMATOLOGIQUE MEDULLAIRE DES MALADES ETUDIES ATTEINTS DE L.A.M.

N°	DATE	STADE CLINIQUE	LEUCOCYTOSE (par mm^3)	Mb (%)	PM et My (%)	COLONIES Nombre	taille	nappe
28	24.08	1	151 000	92	0	0	-	+++
32	19.09	1	2 000	5	0	1	50 à 500	-
	10.10	2	300	0	0	30	50 à 200	-
33	30.05	1	1 700	2	0	18	100 à 1000	-
	6.06	2	1 000	0	0	0	-	-
34	2.10	1	2 000	12	2	0	-	-
35	10.11	1	20 000	70	1	0	-	+ (+ ag.)[1]
42	11.02	1	20 000	93	0	0	-	-
49	28.03	1	3 000	40	0	4	50 à 500	-
	13.06	1	1 900	0	0	0	-	-
51	30.05	1	55 000	33	10	0	-	+++
	20.06	1	4 700	0	3	0	-	-
	25.09	1	5 600	3	0	4	50 à 500	-
	6.11	1	9 000	5	2	12	50 à 500	-
52	9.01	1	18 000	63	3	0	-	++ (+ ag.)
53	26.02	1	2 000	75	0	0	-	-
30	3.05	1	3 300	3	2	35	200 à 1000	-
48	8.03	1	12 000	70	1	5	50 à 100	-
23	9.04	1	30 000	92	1	0	-	+++ (+ ag.)

[1] ag. = agrégats

TABLEAU XII.- ETAT HEMATOLOGIQUE SANGUIN DES MALADES ETUDIES ATTEINTS DE L.A.M.

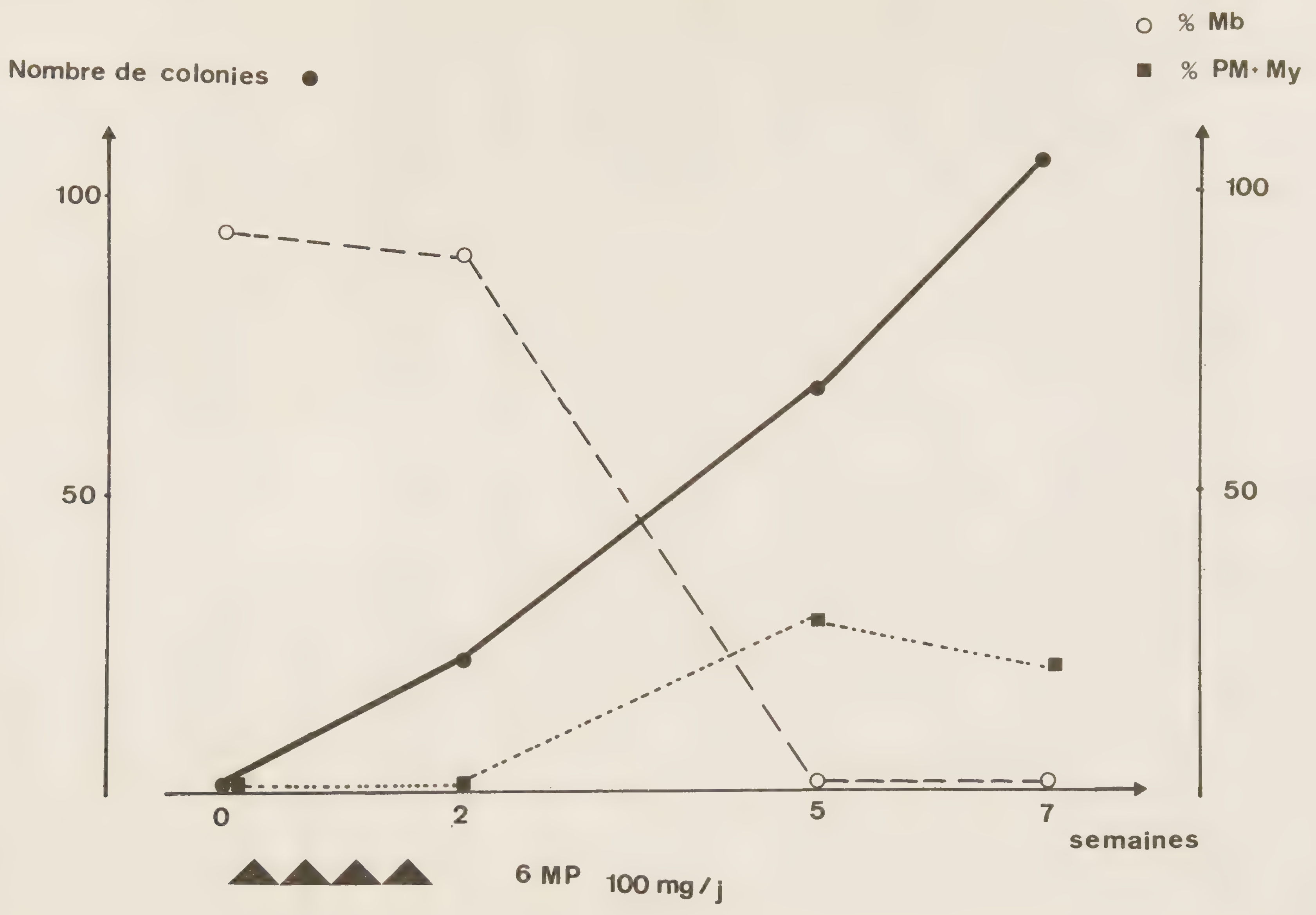


FIGURE 8.- ETUDE SEQUENTIELLE D'UN MALADE ATTEINT DE L.A.M. (N° 42)

sive de celle-ci sous l'influence de la chimiothérapie conduisant à la rémission complète.

5.2.2.2. Les leucémies myéloïdes chroniques

Les résultats globaux concernant les C.F.C. ont déjà été rapportés dans le tableau VI (p 98) et les figures 4 et 5 (p 96-99).

Morphologie et cytologie

Les 3 aspects décrits pour les L.A.M. sont discernables également dans cette catégorie de leucémie ; quelques particularités existent cependant :

- L'absence de toute pousse est rare : 2 cas sur 18 sangs mis en culture, un sur 16 moelles.

- La formation de colonie est l'aspect le plus fréquent ; ces clones, en général très nombreux et de taille modérée, sont denses, souvent sans zone périphérique lâche (cliché 12). Ils sont composés de cellules granuleuses : cellules immatures au début, puis granulocytes matures.

- Certaines moelles et certains sangs donnent en culture une nappe cellulaire (cliché 13, p 95) ; cela est moins fréquent que pour les L.A.M. (3 moelles et 3 sangs) ; cette nappe n'est que rarement isolée (1 cas sur 6), elle s'accompagne d'un nombre variable (5 à 88) de petites colonies (50 à 300 cellules) granuleuses. Cytologiquement, elle est composée en majorité de cellules macrophagiques (cliché 15, p 107).

Lorsque les cellules mises en culture ne sont pas stimulées, aucune prolifération n'apparaît. Dans 4 cas pourtant se développent des agrégats ou des colonies : pour les deux premiers (n° 5-13), la mise en culture de cellules sanguines stimulées donne 150 et 216 colonies, et non stimulées, 2 et 44 colonies. Les deux autres (n° 9-10) prolifèrent en nappes associées à quelques colonies si le C.S.F. est présent ; en son absence se développent un certain nombre d'agrégats.

Nombre et taille des colonies

Comme cela a déjà été dit, nous avons divisé les L.M.C. en 3 classes selon leur stade évolutif : 1. première poussée, 2. rechute, aplasie ou "pré-acutisation", 3. phase aiguë vraie.

Les résultats concernant le nombre de C.F.C.-A des L.M.C. sont consignés dans le tableau XIII. Le détail de l'état hématologique des malades est donné dans les tableaux XIV et XV.

STADE CLINIQUE	NOMBRE DE MALADES ETUDIES	ETUDE DES CELLULES MEDULLAIRES			ETUDE DES CELLULES SANGUINES		
		Nombre de moelles étudiées	Nombre moyen de colonies	nappe	Nombre de sangs étudiés	Nombre moyen de colonies	nappe
1	2	2	875	0	1	330	0
2	11	11	140	3	15 (dont 3 Spl.M.)	318	2
3	3	3	18	0	2	0	1

TABLEAU XIII.- REPARTITION ET RESULTATS DES CULTURES DE MOELLE ET DE SANG DES L.M.C.

La figure 4 (p 96) montre que le nombre de C.F.C.-A médullaires de L.M.C. est situé dans la grande majorité des cas au dehors des limites normales.

Lors de la première poussée, il existe dans la moelle et le sang de nombreuses C.F.C.-A ; les clones qu'elles engendrent sont de taille normale ou réduite (1 000 cellules au maximum).

Lors de la période 2, dite compliquée, les résultats sont plus

N°	DATE	STADE CLINIQUE	LEUCOCYTOSE (par mm^3)	Mb (%)	PM et My (%)	COLONIES Nombre	taille	nappe
1	25.09	2	8 500	1	4	1	100	-
	10.01	2	36 000	1,5	51, 5	72	50 à 500	-
5	20.12	2	56 000	15	19	150	50 à 200	-
	21.02	2	2 800	4	15	11	50 à 200	-
6	14.08	Spl. M.	19 200	-	4	0	-	-
7	14.06	3	5 400	39	5	0	-	+
8	18.09	1	240 000	9	31	330	500 à 1 000	-
12	13.06	2	5 400	-	25	2 000	50 à 1 000	-
13	16.08	Spl. M.	22 000	10	22	68	50 à 400	-
	2.10	"	71 000	21	20	216	50 à 500	-
14	12.08	2	231 000	3	26	290	50 à 150	-
17	25.09	2	16 000	12	30	93	50 à 200	-
	6.11	2	2 200	4	15	45	50 à 1 500	-
21	17.04	3	8 900	76	0	0	-	-
22	18.09	2	30 000	30	23	37	50 à 300	-
10	28.03	2	36 000	1	11	19	50 à 150	++
11	5.03	2	42 000	11	18	488	50 à 500	-
9	2.04	2	148 000	4	19	5	200 à 300	++

TABLEAU XV.- ETAT HEMATOLOGIQUE SANGUIN DES MALADES ETUDIES ATTEINTS DE L.M.C.

N°	DATE	STADE CLINIQUE	CELLULARITE	Mb (%)	PM et My (%)	COLONIES Nombre	taille	nappe
1	10.01	2	++	9	21	16	50 à 500	-
5	20.12	2	+++	8	17,5	88	50 à 200	++
	21.02	2	++	13,5	16	29	50 à 500	-
14	17.08	2	++++	4	21	250	50 à 150	-
17	25.09	2	+	15	31	182	50 à 200	-
	6.11	2	+	18	28	100	50 à 2 000	-
22	18.09	2	+++	12	32	34	50 à 300	-
8	18.09	1	++++	7	31,5	152	50 à 200	-
19	7.02	3	++	74	7	27	50 à 300	-
	7.03	3	+++	96	0	27	100 à 300	-
21	17.04	3	++++	99	0	0	-	-
10	28.03	2	++++	2	15	18	50 à 200	++
11	5.03	2	++	8	26	492	50 à 500	-
16	15.03	1	+++	6	26	1 600	50 à 1 000	-
9	2.04	2	+	2,5	19	7	200 à 300	+++
15	28.08	2	+	12	24,5	17	50 à 100	-

TABLEAU XIV.- ETAT HEMATOLOGIQUE MEDULLAIRE DES MALADES ETUDIES ATTEINTS DE L.M.C.

variables : 3 moelles forment moins de colonies que normalement ; ces colonies sont de petite taille (500 cellules). 5 en forment davantage : leur taille est plus variable mais en règle modérée. Enfin, 3 moelles donnent lieu à la formation de nappes cellulaires qui sont toujours accompagnées de colonies (88-18 et 7).

En période aiguë, une des moelles, composée à 99 % de myéloblastes, ne donne pas de clones cellulaires ; les 2 autres, provenant du même malade en donnent 27 de petite taille.

La culture de cellules sanguines donnent des résultats voisins de celle des cellules médullaires.

Parmi les malades dont les cellules sanguines ou médullaires ont donné en culture une nappe cellulaire, un seul était en phase aiguë vraie ; les 3 autres étaient en phase 2 et avaient au moment de l'étude une leucoblastose sanguine et médullaire modérée (1 %, 4 % et 15 % pour le sang ; 8 %, 2 % et 2,5 % pour la moelle).

5.2.2.3. Les états préleucémiques

Deux malades (n° 55-56) ont été particulièrement étudiés (figure 9, tableau XVI). Ils forment tous les deux un nombre anormal de colonies *in vitro*.

L'un d'eux, atteint d'une anémie réfractaire à myéloblastose partielle, a été étudié à 4 reprises ; l'évolution n'a pas été jusqu'à la L.A.M. : le décès est survenu 4 mois après la dernière étude *in vitro* dans un tableau d'insuffisance respiratoire aiguë consécutive à des lésions pulmonaires intenses, tuberculeuses et aspergillaires.

Le trouble de la différenciation et de la prolifération des C.F.C.-A est manifeste ; il s'aggrave au cours de l'évolution alors que le compartiment granuleux différencié conserve une taille normale. Il semble que l'anomalie décelée *in vitro* de la cellule progénitrice, précède les manifestations hématologiques.

Le 2ème malade a un compartiment en culture très différent ; il s'agissait d'un homme de 75 ans, hospitalisé pour un état infectieux

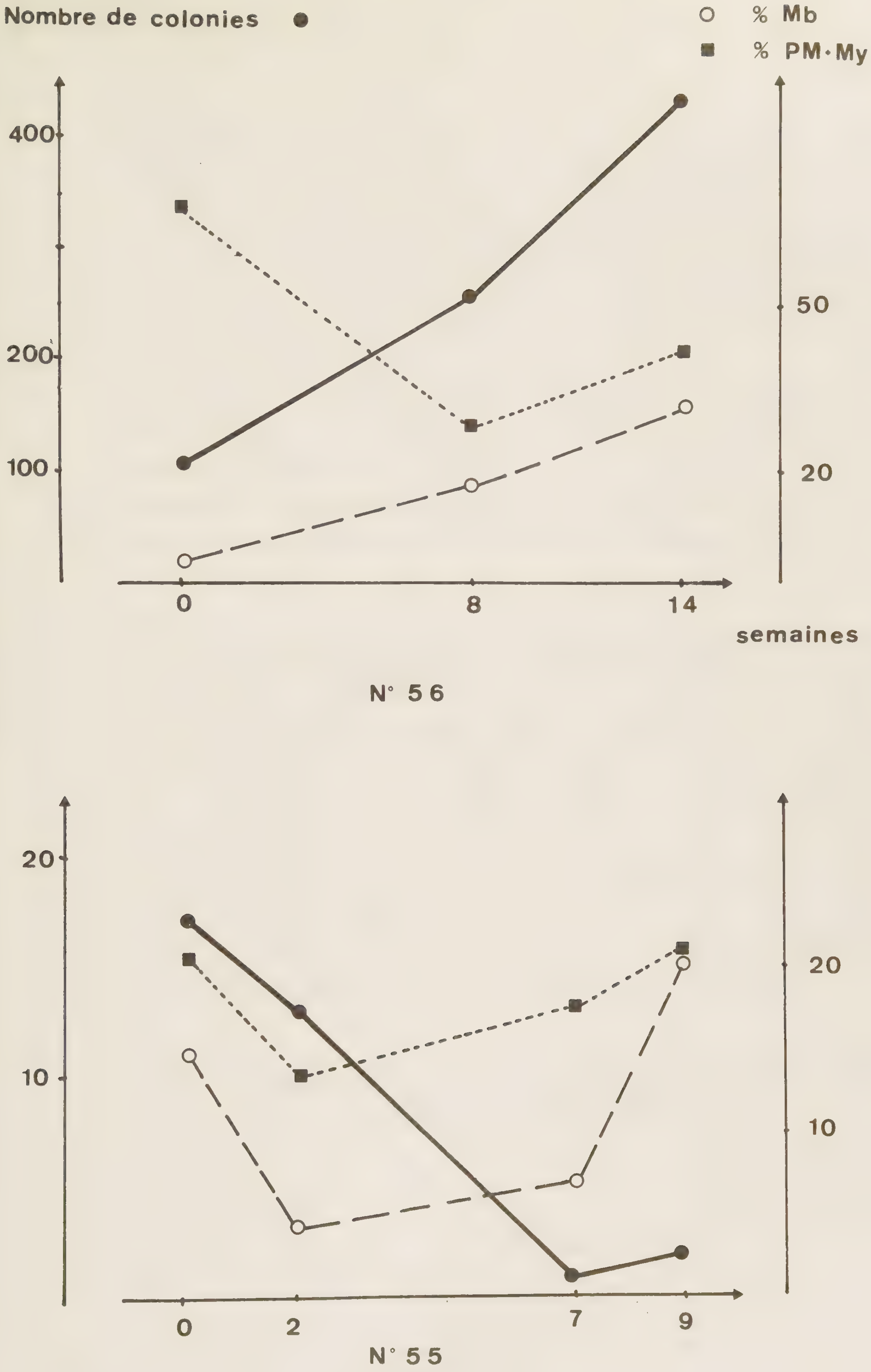


FIGURE 9.- ETUDE SEQUENTIELLE DE 2 MALADES ATTEINTS DE PRELEUCEMIE

pulmonaire et chez lequel ont été découverts une myélémie dans le sang périphérique et dans la moelle une prolifération intense de la lignée granuleuse, avec une accumulation de formes myélocytaires. Après 4 mois d'évolution, ce malade a développé une leucémie aiguë myéloblastique vraie ; à cette période, la moelle mise en culture et stimulée donnait un grand nombre de petites colonies comme auparavant. Cet aspect est voisin de celui que l'on obtient dans les L.M.C.

Ces colonies se sont développées très probablement à partir des myéloblastes leucémiques : en effet, par une méthode de séparation cellulaire en gradient discontinu d'albumine (selon la technique de Dicke), nous avons obtenu une suspension très enrichie en myéloblastes (80 %) ; mise en culture sur agar, elle donnait de nombreuses colonies de 50 à 300 cellules.

MALADE	DATE	RICHESSE MEDULLAIRE	Mb (%)	PM et My (%)	NOMBRE DE COLONIES	TAILLE
55	19.09	+++	14,2	21,8	17	50 à 1 000
	2.10	+++	3,8	13,2	13	50 à 500
	6.11	+++	6,2	15,6	1	300 à 500
	23.11	++	19,8	21,4	2	50 à 500
56	8.01	++++	4	69	104	50 à 500
	7.03	+++	18	20,2	208	50 à 800
	18.04	++++	32,8	42	443	50 à 1 000

TABLEAU XVI.- ETAT HEMATOLOGIQUE MEDULLAIRE DE 2 MALADES PRESENTANT UN ETAT PRELEUCEMIQUE

5.3. RAPPORTS ENTRE LE TAUX DE C.S.F. URINAIRE ET LE NOMBRE DE C.F.C.-A

Aucune relation apparente entre ces deux facteurs n'a pu être mise en évidence dans notre expérimentation.

CHAPITRE 6

DISCUSSION

6.1. SYNTHESE DES TRAVAUX ANTERIEURS

6.2. APPORT DES CULTURES EN GEL D'AGAR DANS LA COMPREHENSION DE LA LEUCEMOGENESE

Dans ce chapître, nous rapporterons d'abord les travaux publiés concernant le C.S.F. et la C.F.C.-A dans les leucémies ; nous discuterons ensuite quelques points particuliers : le rôle des régulateurs dans la leucémogénèse, la nature de la cellule leucémique et la capacité de prolifération et de différenciation de la C.F.C.-A au cours des leucémies.

6.1. SYNTHESE DES TRAVAUX ANTERIEURS

6.1.1. LES SUBSTANCES REGULATRICES

6.1.1.1. Le C.S.F.

Peu d'auteurs ont étudié le taux de C.S.F. au cours des leucémies : dans le tableau I, figurent les résultats déjà publiés ; la référence bibliographique et quelques particularités techniques (quantité de liquide étudié - dialyse préalable ou non - nombre de cellules médullaires de souris mises en culture) sont mentionnés. Les résultats sont exprimés par le pourcentage du nombre de liquides (urine ou sérum) actifs -c'est-à-dire donnant plus de 2 à 5 colonies- ou d'activité supérieure à la normale (le nombre total de sérums ou d'urines étudiées est indiqué entre parenthèse).

Le taux sérique du C.S.F. est généralement plus élevé chez les sujets leucémiques que chez les sujets normaux, mais pour tous les auteurs il n'existe pas de corrélation avec le stade clinique, évolutif de la leucémie aiguë ; au cours des leucémies myéloïdes chroniques, le C.S.F. sérique est à un taux normal pour Metcalf (105), augmenté pour Foster (56).

L'excrétion urinaire du C.S.F. est supérieur à la normale dans près de la moitié des cas de leucémies ; mais selon le type cytologique des leucémies aiguës, les résultats de Robinson et les nôtres divergent :

pour cet auteur, la majorité des urines de L.A.M. ne sont pas actives sur la croissance des colonies, alors que 80 % des urines de L.A.L. ont une activité stimulante supérieure à la normale ; et il semble exister une corrélation entre le stade clinique de la L.A.M. et le taux urinaire du C.S.F.. Chez certains de ses malades, ce taux est nul au moment de la première poussée ; il augmente au cours du traitement pour être normal ou élevé lors de la rémission ; il s'effondre au moment de la rechute.

L'augmentation du taux sérique du C.S.F. lors d'une infection est une réaction normale ; dans l'étude de Metcalf (106), les leucémiques en poussée ont perdu cette possibilité mais la retrouvent pendant la rémission. Toutefois, l'excrétion urinaire augmente lors des infections, que les malades soient en rémission ou en poussée.

Contrairement à Robinson (147), qui en fait une preuve de l'origine granulocytaire du C.S.F., nous n'avons trouvé aucune corrélation entre le taux du C.S.F. urinaire et la leucocytose sanguine (polynucléose neutrophile).

Enfin, il ne semble pas que l'excrétion accrue du C.S.F. soit uniquement la conséquence d'une destruction cellulaire spontanée ou thérapeutique.

La signification de l'augmentation de l'excrétion urinaire du C.S.F. au cours des leucémies aiguës myéloblastiques est difficile à établir : sécrétion augmentée ou absence d'utilisation par les cellules cibles ?

Quoiqu'il en soit, le taux urinaire est, en l'absence d'atteinte rénale, un reflet du taux sérique ; celui-ci n'est probablement pas le témoin du C.S.F. actif au niveau des organes hématopoïétiques, puisque son utilisation se fait pour une bonne part sur le lieu même de sa fabrication (101). Le dosage du C.S.F. urinaire ne donne donc qu'une indication grossière de l'état de ce régulateur dans l'organisme.

AUTEURS	REFERENCE	LIQUIDE TESTE	TECHNIQUE	SUJETS NORMAUX	SUJETS LEUCEMIQUES			
					L.A.	L.A.M.	L.A.L.	L.M.C.
FOSTER	58	sérum	0,20 ml dialyse (-) 50 000 cellules	1 % (100)	-	60 % (11)	52 % (21)	22 % (17)
		sérum	0,15 ml dialyse (-) 50 000 cellules	5 % (45)	15 % (13)	-	-	67 % (12)
FOSTER	56	sérum	0,20 ml dialyse (-) 50 000 cellules	1 % (73) 11	37 % (250)	-	-	-
ROBINSON	147	urine	0,15 ml dialyse (+) 75 000 cellules	100 % (10)	-	38 % (15)	84 % (7)	100 % (8)
METCALF	106	urine	0,15 ml dialyse (+) 75 000 cellules	-	53 % (1 422) > N	-	-	-
		sérum	0,10 ml dialyse (+) 75 000 cellules		30 % (245) > N	-	-	-
GRANSTROM	62	sérum	0,20 ml dialyse (-) 100 000 cellules	-	-	> N	> N	-
Travaux personnels		urine	0,15 ml dialyse (+) 75 000 cellules	0 % (11)	46 % (56)	57 % (38)	29 % (17)	56 % (58)

TABLEAU I.- RESULTATS DU DOSAGE DU C.S.F. DANS LES LEUCEMIES ET CHEZ LE SUJET NORMAL

6.1.1.2. Les inhibiteurs de la granulopoïèse

Plus des 2/3 des sérums de sujets atteints de leucémie aiguë ont des taux sériques d'inhibiteur inférieurs à la normale (inférieur à 50 %) et une grande partie d'entre eux ont un taux nul (30-89-106). La signification clinique de cette chute n'est pas certaine : le taux de ce facteur n'est pas différent chez les malades en rémission et en poussée ; mais Chan (28) admet qu'il diminue plus volontiers en fin d'évolution, et Metcalf (106) qu'il est en relation avec le temps de survie : un taux bas d'inhibiteur est plus fréquent chez les malades dont l'évolution dure moins de 6 mois.

Au cours des leucémies myéloïdes chroniques, les inhibiteurs sériques ont un taux normal, sauf lors de la phase aiguë où il est très bas (105).

Il semble que dans les leucémies, le dosage de l'inhibiteur sérique soit plus intéressant que celui du C.S.F. sérique et urinaire ; les modifications de son taux ont une certaine valeur clinique et pronostique.

6.1.2. ETUDE DE LA FORMATION DES COLONIES EN AGAR DANS LES LEUCEMIES

6.1.2.1. Les leucémies aiguës myéloblastiques

Nombreux sont les auteurs qui ont appliqué la technique de culture de cellules *médullaires* en agar à l'étude des cellules précurseurs de la granulopoïèse au cours des leucémies.

Dans le tableau II, sont rapportés les résultats de ces études pour les L.A.M. en poussée ; la technique utilisée est très sommairement résumée par la nature du stimulant (milieu conditionné (M.C.) ou couche nutritive (C.N.) de globules blancs humains normaux (G.B.)), la nature du milieu semi solide (agar ou méthylcellulose).

Quelles que soient les différentes techniques, l'ensemble de

TABLEAU II.- NOMBRE ET TAILLE DES COLONIES FORMEES À PARTIR DE CELLULES MEDULLAIRES DE L.A.M. EN POUSSEE

AUTEUR	Réf.	TECHNIQUE	NOMBRE NORMAL	NOMBRE DE MOELLES TESTEES	CULTURE STIMULEE		CULTURE NON STIMULE
					Nombre de clones	Taille	Nombre
ISCOVE	73	M.C. de G.B. Méthylcellulose	168	6	18 à 70 M = 42	petite (20 à 50)	0
COWAN	43	M.C. de G.B. Méthylcellulose		25	21/25 < N 2/25 = N 2/25 colonies confluentes		0 0 colonies confluentes
SENN	155	M.C. de G.B. Méthylcellulose	160 à 240	3	0 à 6 M = 2	petite (20 cellules)	-
SULTAN	174	C.N. de G.B. agar	46 à 66 M = 62	18	6/16 = 0 7/16 nappe cellulaire	0	- -
SENN	154	C.N. rein agar	64	5	5/5 = 0	0	-
PARAN	133	M.C. rate agar	200	1	6 000	4 200	-
BROWN	24	M.C. rein méthylcellulose	8 à 48	6	2/8 = 0 reste 1 à 16 M = 5	N + petits agrégats multiples	-
GREENBERG	63	N.C. de G.B. agar	84	16	13/16 = 0 1 = 14 2 : petites colonies abortives	0 N	-
NORTHUP	126	M.C. de G.B. méthylcellulose	46	26	0 à 110 M = 30	-	-
CHERVENICK	34	C.N. de G.B. Méthylcellulose	17 à 110		0 à 12	< N	-
MOORE	122	C.N. de G.B. agar	55	11	0	-	-
Résultats personnels		C.N. de G.B. Agar	80	23	10/23 nappe cellulaire 2 à 40 M = 12	< N	3/23

ces résultats est assez homogène : les cellules médullaires de L.A.M. en poussée ne forment en général pas de colonies ou très peu ; les quelques clones qui peuvent exister sont de petite taille.

Dans certains cas, comme chez 10 de nos 23 malades ou 7 des 16 malades de Sultan, une nappe cellulaire apparaît, ou de multiples petits agrégats (63-122), ou des colonies confluentes ; ces 3 dénominations recouvrent probablement le même aspect morphologique.

Quelques exceptions existent et chez certains malades, la formation de colonie est normale ou très augmentée. L'image en culture des L.A.M. en poussée n'est donc pas unique.

Cytologiquement, les colonies et les agrégats apparaissent normaux, c'est-à-dire macrophagiques et (ou) granuleux au moment de la lecture et composés de cellules matures (macrophages souvent, polynucléaires et métamyélocytes). Au cours de l'incubation, tous les stades cellulaires (du myéloblaste au polynucléaire) sont visibles et il n'y a pas accumulation de stades immatures.

Fonctionnellement, les granulocytes des clones dérivés de cellules médullaires de leucémiques en poussée sont normaux : Barak (5) ne trouve pas d'anomalie de leur activité phagocytaire ni de leur pouvoir de réduction du nitrobleu de tétrazolium. Lorsqu'il existe des colonies, la différenciation morphologique et fonctionnelle des cellules qui les composent paraît donc normale.

Les nappes cellulaires sont constituées de cellules différenciées, matures : macrophages le plus souvent, mais parfois polynucléaires.

Les cellules médullaires ont été cultivées aussi en l'absence de stimulant ; dans la majorité des cas, aucune colonie n'apparaît. Toutefois, les moelles de 2 de nos malades et celles de 2 malades de Cowan donnent un aspect en culture voisin de celui qu'elles donnaient dans des conditions normales de stimulation, c'est-à-dire une nappe cellulaire ou de multiples agrégats de cellules matures.

Les cultures de cellules sanguines ont été moins étudiées. Pour 2 auteurs (123-174), le nombre de clones formés *in vitro* est impor-

tant (en moyenne 200 à 300) mais dans quelques cas, aucune colonie n'apparaît (3 cas sur 16 pour Robinson) ou un nombre très faible (34) ; ces colonies sont de petite taille, souvent accompagnées d'agrégats ; elles sont constituées de cellules matures (145). Dans une publication récente, Moore (122) décrit un aspect un peu différent : sur 18 cultures, 16 ne donnent aucune colonie mais 4 de ces 16, de nombreux agrégats (1 100 à 87 000 pour 2.10^5 cellules) ; les 2 autres cultures donnent respectivement 65 et 240 colonies.

Nos résultats sont assez voisins de ceux que nous obtenons pour les cultures de moelle (6 cultures de sang ne donnent pas de colonie, 7 en donnent un nombre supérieur à la normale, 5 forment des nappes) mais sont assez différents de ceux que nous venons de décrire puisque nous n'avons jamais obtenu un nombre important de colonies (la moyenne du nombre de colonies données par les cultures positives est de 12).

En résumé, dans près de la moitié des cas de L.A.M. en poussée, il n'y a pas de formation de colonie ; si quelques clones se développent, ils ont une différenciation apparemment normale mais sont de petite taille : la C.F.C.-A qui en est l'origine prolifère moins que la C.F.C.-A normale.

Un certain nombre de malades ont un comportement en culture très différent : il s'agit de la formation de nappe cellulaire, signe d'un défaut de prolifération. Parmi ceux-là, quelques-uns montrent une autonomie relative de leurs cellules proliférantes *in vitro* vis à vis du C.S.F..

Enfin, chez un très petit nombre de malades, la formation de colonie en agar est normale.

Lors des rémissions, tous les auteurs s'accordent à dire que la formation de clones est normale en nombre et en taille (66). Ragab (140) montre qu'après une rémission, la diminution progressive du nombre de clones indique l'évolution vers la rechute.

6.1.2.2. Les leucémies aiguës lymphoblastiques

Le nombre de colonies formées à partir de moelles de L.A.L. varie pour Northup (126) de 0 à 200 (23 malades) ; mais pour les malades non traités, elle reste faible (0 à 10 colonies). Nos résultats sont voisins, puisque lors de la poussée, le nombre de colonies est faible (2 et 12) ; il augmente jusqu'à 99 quand le malade est en rémission.

Les colonies formées à partir de cellules du sang sont peu nombreuses dans notre étude, plus variable dans celle de Mack (84) (3 à 122, moyenne 22, pour 8 malades; aucune pour les 2 autres).

Ces colonies sont granuleuses, formées de cellules matures ; cela suggère que les cellules formant des clones ne font pas partie de la population leucémique lymphoblastique, mais que chez certains de ces malades, un nombre plus ou moins important de précurseurs granuleux persistent et circulent dans le sang périphérique.

6.1.2.3. Les leucémies myéloïdes chroniques

La formation de colonies par les cellules *médullaires* des malades atteints de L.M.C. en phase non aiguë est assez variable (tableau III) : Brown et Chervenick trouvent pour 3 et 5 malades des résultats peu différents de leur valeur normale. Au contraire, le malade de Paran, un des deux de Moore et 6 des nôtres, forment en agar un nombre de clones très élevé.

Quoiqu'il en soit, les colonies sont en général de petite taille, constituées de cellules normalement différenciées, matures au moment de l'examen (granulocytes surtout et macrophages).

La présence de nappe cellulaire, que nous retrouverons 3 fois, ne semble pas avoir été décrite, mais les 2 malades de Moore ont, en plus des colonies, de très nombreux agrégats. On ne peut encore déterminer si l'apparition dans les L.M.C. de nappe cellulaire semblable à celles obtenues dans les L.A.M., a une signification précise (signe d'"acutisation").

AUTEUR	Réf.	TECHNIQUE	Nbre N de colonies	L.M.C. non en phase aiguë			L.M.C. en phase aiguë		
				Nbre de moelles testées	Nbre de colonies	Taille	Nbre de moelles testées	Nbre de colonies	Taille
PARAN	133	M.C. rate agar	200	1	307	< N	2	0 0	-
BROWN	24	M.C. rein	8 à 48	3	31-36-29 + agr.	< N	1	39	< N
CHERVENICK	34	C.N. G.B. méthylcellulose	40	5	30 à 90	< N	-	-	-
RESULTATS PERSONNELS		C.N. G.B. agar	80	12 1	7 à 492 M = 111 1 600	< N	3	27 - 27 0	< N
MOORE	122	C.N. G.B. agar	55	2	36 - 440	< N	1	0	-

TABLEAU III.- NOMBRE ET TAILLE DES COLONIES FORMEES A PARTIR DES CELLULES MEDULLAIRES DE L.M.C.

En l'absence de stimulation, la culture des cellules médullaires de 2 malades (122) induit l'apparition d'un certain nombre d'agrégats.

Les cellules *sanguines* de malades atteints de L.M.C. comme de myélofibrose (35), mises en culture, donnent, pour la plupart des malades, un nombre de clones très supérieur à la normale : 53 pour le malade de Paran, de 20 à 1 680, avec une moyenne de 320 pour les 12 malades de Moore, de 1 à 2 000 avec une moyenne de 275 pour les nôtres. Chez 2 d'entre eux, existe en outre une nappe cellulaire, comme de très nombreux agrégats chez tous les malades de Moore.

Les colonies ont la composition cytologique habituelle et sont de taille un peu supérieure à la normale pour le sang.

En l'absence de stimulant, Moore observe dans 5 cas la formation de clones ; nous l'avons rapporté dans 2 cas.

En phase aiguë, le nombre de colonies formées à partir de cellules médullaires est nul pour 2 malades de Paran, 1 de Moore et 1 des nôtres ; mais il est voisin de la normale dans 3 cas (1 malade de Brown et 2 des nôtres).

Les cellules sanguines prélevées au cours de cette phase et cultivées en agar ne prolifèrent en général pas : 3 malades de Moore, 1 de Paran et 1 des nôtres ne donnent aucune colonie. Dans un cas, nous avons observé la formation d'une nappe cellulaire (1 cas de Moore donne de nombreux agrégats ; 1 cas de Paran, 510 colonies).

6.1.2.4. Les états préleucémiques

La formation de colonie y est anormale.

Dans les dysérythropoïèses, le nombre de clones formés est généralement très inférieur à la normale ; les colonies, petites, sont composées de cellules matures (15 malades de Sultan (175) et 1 des nôtres) ;

cependant, la formation de colonies est augmentée chez 2 malades de Muller Bérat (153).

Dans les anémies aplastiques, un aspect semblable (nombre très faible de colonies) est décrit par Greenberg (63), Robinson (144) et Northup (126).

Parmi les autres états préleucémiques étudiés, l'aspect en culture est analogue pour les 3 malades de Senn (153-155), très différent pour le troisième des nôtres puisque la formation de colonies était très augmentée, semblable à celle que l'on voit dans les L.M.C.

6.2. APPORT DES CULTURES EN GEL D'AGAR DANS LA COMPREHENSION DE LA LEUCEMOGENESE

6.2.1. ROLE DES REGULATEURS DE LA GRANULOPOIESE DANS LA LEUCEMOGENESE

6.2.1.1. L'intervention des régulateurs dans la génèse d'une affection néoplasique a été établie pour les tumeurs des organes endocrines (en particulier l'ovaire). Dans ce cas, des anomalies prolongées du taux des régulateurs normaux (isolées ou associées à l'action d'un virus), peuvent induire le développement d'une tumeur de l'organe cible ; les cellules tumorales d'abord dépendantes vis à vis de l'hormone vont progressivement devenir totalement autonomes.

Rien ne prouve que ce schéma puisse être appliqué à la leucémogénèse humaine, mais certains faits militent en faveur de l'action des substances régulatrices de la granulopoïèse.

6.2.1.2. Le taux des régulateurs (C.S.F. et inhibiteur) est très souvent modifié au cours des leucémies myéloïdes et des états préleucémiques : dans le sérum, le taux du C.S.F. est augmenté et celui des inhibiteurs diminué. Pour certains auteurs, ces perturbations sont en corrélation avec le stade clinique de la maladie et son évolutivité.

Dans de nombreux cas, les cellules leucémiques en culture montrent une certaine dépendance vis à vis du C.S.F.

Pour Metcalf, de très fortes concentrations en C.S.F. empêchent la différenciation normale des C.F.C.-A ; leurs descendants restent relativement indifférenciés et capables de division (102).

Certaines races de souris (Rf) développent une leucémie myéloïde après irradiation ; elle est due à l'action d'un virus de type C, latent ; elle n'apparaît pas si l'on irradie des souris Rf élevées stérilement, mais se développe si, après irradiation, des bactéries ou de l'endotoxine leur sont injectées ; dans ce cas, il semble que la capacité du virus d'induire une leucémie dépende d'une pression proliférante appliquée par le C.S.F. à la cellule altérée par le virus : le clone anormal (leucémique) peut alors apparaître (102).

6.2.1.3. **Il est difficile** de définir de façon précise le rôle que peuvent jouer les régulateurs de la granulopoïèse et leur déséquilibre dans la leucémogénèse : il peut s'agir d'une action dans l'induction du phénomène leucémique ou dans son maintien.

On peut penser avec Metcalf qu'un déséquilibre du système régulateur favorisant la prolifération, permet l'émergence de populations anormales ; en effet, il pourrait modifier l'expression phénotypique du matériel génétique de la cellule en déréprimant une partie du génome ; si cela se produit dans une cellule altérée par un agent leucémogène, la dérépression provoque l'activation d'une cellule aux propriétés anormales.

Une autre hypothèse (96) serait que les régulateurs agissent non plus dans l'apparition de populations cellulaires leucémiques, mais dans leur maintien, leur croissance ou leur élimination ; il est nécessaire que les cellules leucémiques soient encore sensibles à l'action des substances régulatrices ; dans ce cas, un équilibre normal des régulateurs les élimine, un déséquilibre favorise leur maintien. Ce mécanisme pourrait jouer jusqu'au moment où les cellules leucémiques deviennent autonomes.

6.2.2. NATURE DE LA CELLULE LEUCEMIQUE

6.2.2.1. Identité et propriétés

La cellule leucémique est-elle une C.F.C.-A ? En d'autres termes, les clones apparus en culture sur agar dérivent-ils d'une cellule leucémique ?

Il semble que dans la plus grande partie des cas de L.A., les colonies sont la descendance de C.F.C.-A normales, qui persistent à côté des cellules leucémiques ; il existe en effet, un certain parallèlisme entre le nombre de ces cellules et la taille du compartiment différencié normal médullaire ; les nappes cellulaires et les agrégats proviendraient de la multiplication limitée et de la différenciation des myéloblastes leucémiques (on ne les trouve pas dans les cultures de moelle ou de sang de L.A.L.).

Mais un de nos malades (n° 56) contredit cette hypothèse : les colonies de petite taille et les agrégats développés *in vitro* dérivent très probablement des cellules leucémiques ; en effet, les fractions 2 et 3, obtenues après séparation de la suspension médullaire en gradient discontinu d'albumine, contiennent 80 et 85 % de myéloblastes leucémiques et donnent en culture sur agar un nombre très important de colonies et d'agrégats.

Moore et Metcalf (119) sont partisans de l'origine leucémique des clones développés *in vitro* ; dans 2 cas de L.A.M., ils retrouvent, comme Duttera (51), dans les colonies et les agrégats l'anomalie chromosomique qui existait *in vivo* ; toutefois, des C.F.C.-A normales et leucémiques peuvent coexister puisque pour 1 malade, 27 % des métaphases apparues *in vitro*, et examinées, avaient un caryotype normal. Mais l'analyse chromosomique apporte aussi un élément en faveur de l'hypothèse précédente : la moelle d'un malade atteint de L.A.M. donne en culture, un petit nombre de vraies colonies, et de nombreux agrégats : le caryotype des colonies est normal ; celui des agrégats montre l'anomalie chromosomique présente *in vivo*.

Il apparait que le plus souvent les cellules leucémiques ne forment pas de colonies *in vitro*, mais que dans certains cas, elles peuvent posséder cette caractéristique fonctionnelle des cellules précurseurs de la granulopoïèse normale ; ainsi, la morphologie leucémique ne signifie pas forcément que le déficit fonctionnel est profond (prolifération et différenciation).

Dans les L.M.C., la C.F.C.-A est pour Metcalf (119) une cellule leucémique puisque toutes les colonies développées *in vitro*, portent le chromosome Ph1 ; pour Chervenick (38), au contraire coexistent C.F.C.-A leucémiques et C.F.C.-A normales.

Moore (122) a pu étudier quelques caractéristiques fonctionnelles des C.F.C.-A leucémiques des L.M.C. et des L.A.M. (dans les rares cas où elles se différencient) et celles des cellules formant des agrégats en agar.

Dans les L.A.M., 17 % des cellules formant les agrégats sont en cycle cellulaire, et 24 % dans les L.M.C. (45 à 60 % chez le sujet normal). Les cellules ont un cycle plus long qu'à l'état normal ou sont en Go. En rémission, la cinétique des C.F.C.-A redevient normale.

La densité des C.F.C.-A et des cellules formant des agrégats est presque toujours supérieure à 1,062 chez le sujet normal (étude en gradient continu d'albumine). Au contraire, dans les L.M.C. en période chronique, la plupart des C.F.C.-A (69 %) ont une densité inférieure à 1,062. Dans les L.A.M., 29 % des cellules formant des agrégats ont une densité inférieure à 1,062 comme dans les L.M.C. en phase aiguë.

Cette faible densité est peut-être le reflet d'un asynchronisme de maturation nucléocytoplasmique.

En rémission, la densité des C.F.C.-A et des cellules formant des agrégats devient normale, même dans les L.M.C., où le chromosome Ph1 persiste.

6.2.2.2. Réponse aux stimulants

Les C.F.C.-A normales sont dépendantes de la présence, dans le milieu de culture, de C.S.F.. En l'absence de ce facteur stimulant, la plupart des suspensions sanguines ou médullaires de L.M.C. ou de L.A.M. ne prolifèrent pas *in vitro*. Les cellules formant des agrégats ou les C.F.C.-A ne sont donc pas autonomes vis à vis des substances régulatrices.

Toutefois, pour certains de nos malades, comme pour certains de ceux décrits par Moore (6 sur 17), des agrégats ou des nappes cellulaires apparaissent même lorsqu'aucun stimulant n'est ajouté à la culture. Leur nombre est en général inférieur à celui obtenu dans les cultures stimulées. Certaines cellules formant des agrégats ont perdu, au moins partiellement, leur dépendance vis à vis du stimulant, mais elles lui restent sensibles.

6.2.2.3. Production de stimulant par les cellules leucémiques

Paran et Bradley (17) ont montré chez la souris que les cellules de leucémies aiguës lymphoblastiques ou myéloblastiques pouvaient libérer ou sécréter un facteur non dialysable capable de stimuler la croissance des colonies.

Mais chez l'homme, cela n'a pas été démontré, et les suspensions de cellules médullaires ou sanguines ne sécrétent pas de C.S.F..

6.2.3. DEFAUT DE DIFFERENCIATION DE LA CELLULE LEUCEMIQUE

L'absence de toute colonie dans la plupart des cultures de moelle ou de sang de *L.A.M.* est une preuve des anomalies majeures de prolifération et de différenciation des cellules leucémiques. Mais l'apparition dans certains cas de nappes ou d'agrégats de cellules matures est le témoin d'une prolifération toujours perturbée, même si la diffé-

renciation est presque normale.
Enfin, de rares malades montrent *in vitro* une prolifération et une différenciation des cellules leucémiques normales (dans notre série, le malade n°56); certains décrits par Moore (122), chez lesquels l'anomalie chromosomique présente *in vivo* est retrouvée dans les cellules des colonies ; enfin, 1 malade de Paran (133). Ce dernier auteur utilise un stimulant particulier (milieu conditionné de rate humaine) ; peut-être celui-ci est-il nécessaire pour induire la prolifération des cellules leucémiques ? il est plus probable que dans certains cas, les propriétés de différenciation et de prolifération sont conservées par les cellules leucémiques ; cela est à rapprocher de la 3ème théorie de la leucémogénèse que nous avons rappelée dans le chapître 1 : ces cellules normalement proliférantes appartiendraient à une population fonctionnellement peu leucémique.

Dans les *L.M.C.*, les anomalies, bien que moins évidentes, existent : la taille des colonies est en général faible, les cellules qui les composent sont en majorité des myélocytes et métamyélocytes.

Mais dans certains cas, lors de l'apparition de nappes cellulaires, ces perturbations sont plus importantes et rejoignent celles qui existent dans les L.A.M..

La L.M.C. est considérée par certains auteurs comme un état préleucémique, aboutissant à l'éclosion d'une L.A.M. : *in vivo* existe une accumulation des cellules du compartiment granulocytaire prolifératif, puis apparaît le blocage de la différenciation. *In vitro*, l'aspect est très voisin : accumulation des C.F.C.-A lors de la période chronique, puis perte de la prolifération et de la différenciation normale de ces cellules lors de la phase aiguë.

Mais on ne sait pas pourquoi l'accroissement du pool prédifférencié et du pool prolifératif est suivi du blocage de la différenciation.

6.2.4. LA TECHNIQUE DE CULTURE SUR AGAR montre que des anomalies des régulateurs de la granulopoïèse et de la prolifération et de la différenciation de leur cellule cible (la C.F.C.-A) existent au cours des L.A.M.

et des L.M.C. en poussée ; ces cellules restent en partie sensibles ou dépendantes à l'égard du C.S.F. ; une anomalie isolée de substances régulatrices ne paraît pas suffire à expliquer la leucémogénèse.

Mais cette méthode d'étude ne permet pas encore de savoir, de façon définitive, si la cellule leucémique fait partie du pool des cellules précurseurs ou des cellules souches, de connaître les relations exactes qui existent entre C.F.C.-A normale et pathologique (coexistence ou présence unique de cellules leucémiques dont certaines se différencient et prolifèrent normalement).

L'association à cette technique de méthodes de séparation cellulaire de plus en plus fines permettra peut-être de résoudre ces problèmes.

En dehors de ses apports dans la compréhension du phénomène leucémique, la culture sur agar permet une meilleure définition des états préleucémiques et de la rémission des leucémies.

D'autres applications de cette technique ont été décrites (98) : test de viabilité des cellules après congélation, appréciation de l'hématopoïèse résiduelle après traitement radiothérapique ou chimiothérapique.

CONCLUSIONS

La technique de culture en gel d'agar des cellules hématopoïétiques a permis d'introduire dans le modèle général de la granulopoïèse un compartiment cellulaire intermédiaire entre celui de la cellule souche totipotentielle et le compartiment prolifératif. Ces cellules prédifférenciées (C.F.C.-A, colony forming cell in agar) se caractérisent par une propriété fondamentale : celle de former, sur agar, en présence d'un stimulant (le C.S.F. - colony stimulating factor) des clones cellulaires. Ce test simple pratiqué *in vitro*, permet d'étudier les différents facteurs intervenant dans l'expression de la formation des colonies.

L'existence de substances inhibitrices *in vitro* de la différenciation de la C.F.C.-A, présentes dans le sérum a pu être prouvée. Leur rôle physiologique dans la régulation de la granulopoïèse reste, pour l'essentiel, à démontrer.

Cependant, la mise en évidence dans les leucémies humaines, grâce à cette technique de culture en gel d'agar, d'un trouble profond de la formation des colonies d'une part, et d'autre part d'anomalies du taux des substances régulatrices, suscite un grand intérêt dans la recherche de la pathogénie de ces maladies.

Nous avons étudié ainsi 31 leucémiques aiguës, 29 leucémies myéloïdes chroniques et 3 états préleucémiques, à différents moments de leur évolution.

L'excrétion urinaire du C.S.F. dans ces affections est augmentée par rapport à celle des sujets normaux, toujours trouvée nulle. Mais ces variations ne sont pas en relation avec le stade clinique et de nombreux facteurs non spécifiques, en particulier les infections, interviennent pour modifier le taux urinaire, qui n'est qu'un reflet global du C.S.F. de l'organisme, sécrété dans de nombreux tissus et pour une bonne part actif localement. L'augmentation du taux du C.S.F. urinaire ou sérique ne paraît pas être un facteur important dans la pathogénie des leucémies ; mais l'association de cette anomalie avec un effondrement du taux des substances inhibitrices pourrait jouer un rôle dans le déclenchement et le maintien du processus leucémique.

La formation de colonies *in vitro* à partir de cellules médullaires ou sanguines est perturbée dans les leucémies aiguës, myéloïdes chroniques et les états préleucémiques.
Dans la très grande majorité de nos cas de leucoses aiguës, la cellule leucémique est incapable de former des colonies *in vitro*. Parfois cependant, ces cellules, stimulées par le C.S.F., peuvent proliférer en "nappe cellulaire" ou en agrégats constitués de cellules macrophagiques le plus souvent, mais aussi d'éléments granuleux. Dans quelques cas où une certaine formation de colonies (toujours inférieure à la normale) persiste, on peut supposer que ces colonies se sont développées à partir de C.F.C.-A normales, coexistant avec le clone leucémique. Enfin, chez un sujet (n° 56) il existe un nombre élevé de colonies et d'agrégats développés probablement aux dépens des cellules leucémiques.
Dans les L.M.C. le nombre de colonies est le plus souvent augmenté ; mais les clones formés sont de taille réduite. Dans cette affection, l'augmentation de taille du compartiment prolifératif granuleux est donc prolongée par celle du compartiment prolifératif prédifférencié ; mais il semble exister en outre un défaut de la prolifération et de la différenciation *in vitro* qui s'exprime par la petite taille des colonies et, dans certains cas de L.M.C. en rechute, par la formation de nappes cellulaires identiques à celles observées dans les L.A.M..

Cette étude nous a donc permis de mettre en évidence un déficit important de la formation des colonies dans les L.A.M. ; cependant, les cellules leucémiques gardent une certaine réactivité à la stimulation par le C.S.F. et, dans un cas, une formation de colonies analogue à celle observée dans les L.M.C. persistait.

Ainsi, il semble que la cellule cible du processus leucémique appartient au compartiment précurseur de la granulopoïèse, capable de former des clones sur agar, et que la transformation leucémique s'accompagne, *in vitro* comme *in vivo*, d'un blocage plus ou moins complet de la différenciation. De nouvelles perspectives thérapeutiques doivent être envisagées, qui visent à obtenir un déblocage de la différenciation des cellules leucémiques et non plus leur éradication.

La technique de culture en gel d'agar des cellules hématopoïétiques a un grand intérêt dans cette nouvelle approche de la leucémogénèse. En pratique médicale, elle apporte un moyen de mieux préciser le stade clinique de la rémission leucémique et de mieux définir les états de préleucémie.

ABREVIATIONS ET DEFINITIONS

A.D.N. = acide désoxy-ribonucléique
C.F.C.-A ou C.F.C. *in vitro* = cellule formant des colonies en agar
C.F.C.-S = cellule formant des colonies dans la rate
C.I.F. = facteur inhibant les colonies
C.S.F. = facteur stimulant les colonies
C.S.H. = cellule souche hématopoïétique
Etat Pr.L. = état préleucémique
3HTdR = thymidine tritiée
3HDFP = diisopropylfluorophosphate tritié
L.A. = leucémie aiguë
L.A.L. = leucémie aiguë lymphoblastique
L.A.M. = leucémie aiguë myéloblastique
L.A. Mono = leucémie aiguë monoblastique
L.A. Pro My = leucémie aiguë promyélocytaire
L.M.C. = leucémie myéloïde chronique
Lb = lymphoblastes
Ma = macrophage
Mb = myéloblastes
MM = métamyélocytes
6 MP = 6 mercapto-purine
Mo = monocyte
M.T.X. = méthotrexate
My = myélocyte
P.A.L. = phosphatases alcalines leucocytaires
PN = polynucléaires
S.C. = sérum de cheval
Spl. M. = splénomégalie myéloïde
S.V.F. = sérum de veau foetal

Milieu conditionné : surnageant d'une culture cellulaire ou tissulaire en milieu liquide

Souris W/W^V : souche de souris congénitalement anémique.
L'allèle W est léthal ; l'allèle W^V induit une anémie sévère mais la souris est viable. Ces allèles influencent à la fois l'érythropoïèse et la granulopoïèse et agissent au niveau de la C.S.H. qu'ils rendent défectueuse.

Suicide à la thymidine tritiée : les cellules en phase S (synthèse de l'A.D.N.) incorporent la thymidine ; si cette substance est marquée par du tritium à haute activité spécifique, la cellule va subir des lésions radio induites léthales.
Dans le cas des cultures en agar, on ensemence d'une part des cellules préalablement incubées avec la thymidine tritiée, d'autre part des cellules non incubées. Le rapport du nombre des colonies obtenues à partir de ces 2 suspensions cellulaires correspond au rapport du nombre de C.F.C.-A qui ne sont pas en phase S sur le nombre de C.F.C.-A total.

B I B L I O G R A P H I E

1. ATHENS J.W.
   Neutrophilic granulocyte kinetics and granulocytopoiesis.
   In : Regulation in Hematopoiesis, Ed. A.S. Gordon, N.Y., Appleton Cent. Crofts, 1970, 1143-1166.

2. ATHENS J.W., and RAAB S.O.
   The total blood circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects.
   J. Clin. Invest., 1961, *40,* 1, 989-995.

3. AUSTIN P.E., McCULLOCH E.A., TILL J.E.
   Characterization of the factor in L-cell conditionned medium capable of stimulating colony formation by mouse marrow cells in culture.
   J. Cell. Physiol., 1971, *77,* 121-134.

4. BACCARANI M., KILLMANN S.A.
   Evidence against human bone marrow lymphocytes being committed haemopoietic stem cells.
   Scand. J. Haemat., 1972, *9,* 339-342.

5. BARAK Y., SHORE N., HIGGINS G. and VADAKAN V.
   Functionnal cellular maturation in human leukemic bone marrow cultures.
   Proc. Am. Ass. Cancer Res., 1973, *14,* 94 (abst.)

6. BECKER A.J., McCULLOCH E.A., SIMINOVITCH L. and TILL J.E.
   The effect of differing demands for blood cell production on DNA synthesis by hemopoietic colony-forming cells of mice.
   Blood, 1965, *26,* 296-308.

7. BENNET M., CUDKOWICZ G., FOSTER R.S., Jr., and METCALF D.
   Hemopoietic progenitor cells of W anaemic mice studied *in vivo* and *in vitro*.
   J. Cell. Physiol., 1968, *71,* 211.

8. BERTHIER R.
Etude d'une culture d'érythroblastes à court terme. Rôle de l'érythropoïétine.
Thèse de Médecine, GRENOBLE, 1969, n° 40.

9. BESSIS M.
Cellules du sang normal et pathologique. Masson et Cie, Paris, 1972.

10. BLOCK M., JACOBSON L.O. and BETHARD W.F.
Preleukemic acute human leukemia.
J.A.M.A., 1953, *152*, 1018-1028.

11. BOGGS D.R.
Data on the cause of leukemia.
New Engl. J. Med., 1971, *284*, 1267-1268.

12. BOGGS D.R., ATHENS J.W., CARTWRIGHT G.E. and WINTROBE M.M.
Leukokinetic studies.IX. Experimental evaluation of a model of granulopoiesis.
J. Clin. Invest., 1965, *44*, 643-651.

13. BOGGS D.R., CHERVENICK P.A., MARSH J.C., PILGRIM H.I., CARTWRIGHT G.E. and WINTROBE M.M.
Granulopoiesis in Germfree Mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, *125*, 325-330.

14. BRADLEY T.R.
Aspects of stimulation of bone marrow colony growth *in vitro*.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1968, *46*, 335-342.

15. BRADLEY T.R.
Colony stimulating activity in mouse tissues.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 67-72.

16. BRADLEY T.R. and METCALF D.
The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1966, *44*, 287-300.

17. BRADLEY T.R., METCALF D. and ROBINSON W.A.
Stimulation by leukaemic sera of colony formation in solid agar cultures by proliferation of mouse bone marrow cells.
Nature, 1967, *213*, 926-927.

18. BRADLEY T.R., METCALF D., SUMMER M. and STANLEY R.
Characteristics of *in vitro* colony formation by cells from hemopoietic tissues.
In : Hemic cells in vitro, Ed. P. FARNES, Williams & Wilkins Cie, Baltimore, 1969, 22-35.

19. BRADLEY T.R., ROBINSON W. and METCALF D.
Colony production *in vitro* by normal polycythaemic and anaemic bone marrow.
Nature, 1967, *214*, 511.

20. BRADLEY T.R., STANLEY E.R. and SUMMER M.A.
Factors from mouse tissues stimulating colony growth of mouse bone marrow cells *in vitro*.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1971, *49*, 595-603.

21. BRADLEY T.R. and SUMMER M.A.
Stimulation of mouse bone marrow colony growth *in vitro* by conditioned medium.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1968, *46*, 607-618.

22. BRADLEY T.R., TELFER P.A. and FRY P.
The effect of erythrocytes on mouse bone marrow colony development *in vitro*.
Blood, 1971, *38*, 353-359.

23. BROMMER E.J.P.
The role of the stem cell in rauscher murine leukaemia.
Thèse. Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1973.

24. BROWN C.H.,III. and CARBONE P.P.
In vitro growth of normal and leukemic human bone marrow.
J. Nat. Cancer Inst., 1971, *46*, 989-1000.

25. BULL J.M., DUTTERA M.J., STASHICK E., HENDERSON E.S. and CARBONE P.P.
Serial studies of *in vitro* colony formation in patients with acute myelocytic leukemia.
Clin. Res., 1972, *20*, 564 (abst.).

26. CARTWRIGHT G.E., ATHENS J.W. and WINTROBE M.M.
The kinetics of granulopoiesis in normal man.
Blood, 1964, *24*, 780-803.

27. CHAN S.H.
Studies on colony-stimulating factor (CSF) : role of the kidney in clearing serum CSF (34871).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1970, *134*, 733-737.

28. CHAN S.H.
Influence of serum inhibitors on colony development *in vitro* by bone marrow cells.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1971, *49*, 553-564.

29. CHAN S.H.
Bone marrow colony stimulating factor (CSF) and inhibitor levels in renal disease.
Rev. Europ. Etudes clin. et biol., 1972, *17*, 686-689.

30. CHAN S.H. and METCALF D.
Inhibition of bone marrow colony formation by normal and leukaemic human serum.
Nature, 1970, *227*, 845-846.

31. CHAN S.H. and METCALF D.
Local production of colony-stimulating factor within the bone marrow : role of nonhematopoietic cells.
Blood, 1972, *40*, 646-653.

32. CHAN S.H. and METCALF D.
Local and systemic control of granulocytic and macrophage progenitor cell regeneration after irradiation.
Cell Tissue Kin., 1973, *6*, 185-197.

33. CHAN S.H., METCALF D. and STANLEY E.R.
Stimulation and inhibition by normal human serum of colony formation *in vitro* by bone marrow cells.
Brit. J. Haemat., 1971, *20*, 329-341.

34. CHERVENICK P.A.
Growth and morphologic description of colonies arising from non leukemic and leukemic blood and marrow.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DICKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 275-278.

35. CHERVENICK P.A.
Increased number of stem cells in blood of patients with myelofibrosis.
Blood, 1972, *40*, 935. (abst.)

36. CHERVENICK P.A. and BOGGS D.R.
Bone marrow colonies : stimulation *in vitro* by supernatant from incubated human blood cells.
Science, 1970, *169*, 691-692.

37. CHERVENICK P.A. and BOGGS D.R.
In vitro growth of granulocytic and mononuclear cell colonies from blood of normal individuals.
Blood, 1971, *37*, 131-135.

38. CHERVENICK P.A., ELLIS L.D., PAN S.F. and LAWSON A.L.
Growth of colonies from CML marrow containing the Philadelphia chromosome.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DICKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 319-323.

39. CHERVENICK P.A. and LOBUGLIO A.F.
Human blood monocytes : stimulators of granulocyte and mononuclear colony formation *in vitro*.
Science, 1972, *178*, 164-166.

40. CLARKSON B.D.
Review of recent studies of cellular proliferation in acute leukaemia.
In : Human tumor cell kinetics, Nat. Cancer Inst., Bethesda, 1969, monograph n° 30, 81-120.

41. CLARKSON B.D.
Acute myelocytic leukemia in adults.
Cancer, 1972, *30,* 1572-1582.

42. CLINE M.J., WARNER N.L. and METCALF D.
Identification of the bone marrow colony mononuclear phagocyte as a macrophage.
Blood, 1972, *39,* 326-330.

43. COWAN
The heterogeneity of cells culture findings in patients with acute myeloblastic leukemia.
Communication orale - Paris - octobre 1972.

44. CRONKITE E.P. and VINCENT P.C.
Granulocytopoiesis.
Series Haemat., 1969, *II,* 3-43.

45. DALE D.C., BROWN C.H., CARBONE P. and WOLFF S.M.
Cyclic urinary leukopoietic activity in grey collie dogs.
Science, 1971, *173,* 152-153.

46. DALE D.C., WARD S.B., KIMBALL H.R. and WOLFF S.M.
Studies of neutrophil production and turnover in grey collie dogs with cyclic neutropenia.
J. Clin. Invest., 1972, *51,* 2190-2196.

47. DICKE K.A.
Bone marrow transplantation after separation by discontinuous albumin density gradient centrifugation.
In : publication of the Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1971.

48. DICKE K.A., PLATENBURG M.G.C. and VAN BEKKUM D.W.
Colony formation in agar : *in vitro* assay for haemopoietic stem cells.
Cell Tissue Kinet., 1971, *4,* 463-477.

49. DICKE K.A. and VAN BEKKUM D.W.
Evidence for the identity of CFUa and CFUs.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DICKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 136-148.

50. DRESCH C. et NAJEAN Y.
Cinétique des polynucléaires neutrophiles chez l'homme.
Rev. Europ. Etudes clin. et biol., 1970, *XV,* 729-739.

51. DUTTERA M.J., WHANG PENG J., BULL J.M.C. and CARBONE P.P.
Cytogenetically abnormal cells *in vitro* in acute leukaemia.
Lancet, 1972, *I,* 715-718.

52. ECSENYI M.
CSF levels and inhibitors in sera from patients with infectious diseases.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DICKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 386-389.

53. FIALKOW J.P., THOMAS E.D., BRYANT J.I. and NEIMAN P.E.
Leukaemic transformation of engrafted human marrow cells *in vivo*.
Lancet, 1971, *i*, 251-257.

54. FLOREY H.W.
Chemotaxis, phagocytosis and abcess formation.
In : Lectures on General Pathology, FLOREY H.W., Lloyd Luke, London, 1954, 94.

55. FOSTER R.S., Jr.
Bone marrow colony-stimulating factor : renal influence on serum titers.
J. Surgic. Oncol., 1970, *2*, 1-8.

56. FOSTER R.S., Jr., METCALF D. and CORTNER J.
Bone marrow colony-stimulating activity in sera of children with acute leukemia.
Cancer, 1971, *27*, 881-886.

57. FOSTER R.S., Jr., METCALF D. and KIRCHMYER R.
Induction of bone marrow colony-stimulating activity by a filterable agent in leukemic and normal mouse serum.
J. Exp. Med., 1968, *127*, 853-866.

58. FOSTER R.S., Jr., METCALF D., ROBINSON W.A. and BRADLEY T.R.
Bone marrow colony stimulating activity in human sera. Results of two independant surveys in Buffalo and Melbourne.
Brit. J. Haemat., 1968, *15*, 147-159.

59. FURTH J.
A meeting of ways in cancer research : thoughts on the evolution and nature of neoplasms.
Cancer Res., 1959, *19*, 241.

60. GOLDE D.W. and CLINE M.J.
Identification of the colony-stimulating cell in human peripheral blood.
J. Clin. Invest., 1972, *51*, 2981-2983.

61. GOLDE D.W., FINLEY T.N. and CLINE M.J.
Production of colony-stimulating factor by human macrophages.
Lancet, 1972, *II*, 1397-1399.

62. GRANSTROM M., WAHREN B., GAHRTON G., KILLANDER D. and FOLEY G.E.
Inhibitors of the bone-marrow colony formation in sera of patients with leukemia.
Int. J. Cancer, 1972, *10*, 482-488.

63. GREENBERG P.L., NICHOLS W.C. and SCHRIER S.L.
Granulopoiesis in acute myeloid leukemia and preleukemia.
New Engl. J. Med., 1971, *284*, 1225-1232.

64. HALL B.M.
The effects of whole body irradiation on serum colony-stimulating factor and *in vitro* colony forming cells in the bone marrow.
Brit. J. Haemat., 1969, *17*, 553-561.

65. HARRIS J.E.
Effect of L asparaginase on the ability of normal mouse bone marrow to form soft agar colonies.
Nature, 1969, *223*, 850-851.

66. HARRIS J. and FREIREICH J.
In vitro growth of myeloid colonies from bone marrow of patients with acute leukemia in remission.
Blood, 1970, *35*, 61-63.

67. HART J.S., TRUJILLO J.M., FREIREICH E.J., GEORGE S.L. and FREI E.
Cytogenetic studies and their clinical correlates in adults with acute leukemia.
Ann. Intern. Med., 1971, *75*, 353-360.

68. HASKILL J.S., McNEILL T.A. and MOORE M.A.S.
Density distribution analysis of *in vivo* and *in vitro* colony forming cells in bone marrow.
J. Cell. Physiol., 1970, *75*, 167-180.

69. HIBBERD A.D. and METCALF D.
Proliferation of macrophage and granulocyte precursors in response to primary and transplanted tumors.
Israël J. Med. Sci., 1971, *7*, 202-210.

70. HOLLARD D., KOLODIE L., MICOUIN Cl., MIKLER F., SCHAERER R. et SOTTO J.J.
Manifestations hématologiques de la tuberculose des organes hémato-poïétiques.
Rev. Méd. Alpes Françaises, 1973, *2*, 251-256.

71. ICHIKAWA Y., PLUZNIK D.H. and SACHS L.
In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies.
Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A., 1966, *56*, 488-495.

72. ICHIKAWA Y., PLUZNIK D.H., and SACHS L.
Feedback inhibition of the development of macrophage and granulocyte colonies. I. Inhibition by macrophages.
Proc. Nat. Ac. Sci., U.S.A., 1967, *58*, 1480-1486.

73. ISCOVE N.N., SENN J.S., TILL J.E. and McCULLOCH E.A.
Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture : effect of conditioned medium from human leukocytes.
Blood, 1971, *37*, 1-5.

74. ISCOVE N.N., TILL J.E. and McCULLOCH E.A.
The proliferation states of mouse granulopoietic progenitor cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1970, *134*, 33-39.

75. KILLMANN S.A.
Acute leukemia : the kinetics of leukemic blast cells in man.
Series Haemat., 1968, *1*, 38-102.

76. KILLMANN S.A.
Acute leukemia : development, remission/relapse pattern, relationship between normal and leukemic hemopoiesis and the "sleeper-to-feeder" stem cell hypothesis.
Series Haemat., 1968, *I*, 103-128.

77. KROGH JENSEN M.
Chromosome studies in acute leukemia. III. Chromosome constitution of bone marrow cells in 30 cases.
Acta Med. Scand., 1967, *182*, 629-644.

78. KURNICK J.E. and ROBINSON W.A.
Colony growth of human peripheral white blood cells *in vitro*.
Blood, 1971, *37*, 136-141.

79. LAHIRI S.K. and VAN PUTTEN L.M.
Location of the Go-phase in the cell cycle of the mouse haemopoietic spleen colony forming cells.
Cell Tiss. Kinet., 1972, *5*, 365-369.

80. LAJTHA L.G.
Stem cell kinetics.
In : Regulation of hematopoiesis, GORDON A.S., N.Y., Appleton Century Crofts, 1970, vol. 1, 111-131.

81. LAJTHA L.G., GILBERT C.W. and GUZMAN E.
Kinetics of haemopoietic colony growth.
Brit. J. Haemat., 1971, *20*, 343-353.

82. LAJTHA L.G., POZZI L.V., SCHOFIELD R. and FOX M.
Kinetic properties of haemopoietic stem cells.
Cell Tiss. Kinet., 1969, *2*, 39-49.

83. LUND J.E., PADGETT G.A. and OTT R.L.
Cyclic neutropenia in grey collie dogs
Blood, 1967, *29*, 452-461.

84. MACK T., ROBINSON W.A. and HOLTON C.P.
Colony growth of peripheral blood cells from patients with acute lymphocytic leukemia.
Cancer Res., 1972, *32*, 2054-2057.

85. McCREDIE K.B., HERSH E.M. and FREIREICH E.J.
Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man.
Science, 1971, *171*, 293-294.

86. McNEILL T.A. and KILLEN M.
The effect of synthetic double-stranded polyribonucleotides on haemopoietic colony-forming cells *in vivo.*
Immunology, 1971, *21*, 751-759.

87. McPHERSON I. and MONTAGNIER L.
Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus
Virology, 1964, *23*, 291-294.

88. MALONEY M.A., PATT H.M. and LUND J.E.
Granulocyte dynamics and the question of ineffective granulopoiesis.
Cell Tiss. Kinet., 1971, *4*, 201-209.

89. MANGALIK A. and ROBINSON W.A.
The effect of serum from patients with acute granulocytic leukemia on granulocyte colony formation *in vitro* : a search for inhibitors.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1972, *141*, 515-518.

90. MANGALIK A. and ROBINSON W.A.
Cyclic neutropenia : the relationship between urine granulocyte colony stimulating activity and neutrophil count.
Blood, 1973, *41*, 79-84.

91. METCALF D.
Potentiation of bone marrow colony growth *in vitro* by the addition of lymphoid or bone marrow cells.
J. Cell. Physiol., 1969, *72*, 9-20.

92. METCALF D.
Cortisone action on serum colony-stimulating factor and bone marrow *in vitro* colony-forming cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1969, *132*, 391-394.

93. METCALF D.
Studies on colony formation *in vitro* by mouse bone marrow cells.
I. Continuous cluster formation and relation of clusters to colonies.
J. Cell. Physiol., 1969, *74*, 323-332.

94. METCALF D.
Studies on colony formation *in vitro* by mouse bone marrow cells.
II. Action of colony-stimulating factor.
J. Cell. Physiol., 1970, *76*, 89-100.

95. METCALF D.
Acute antigen induced elevation of serum colony-stimulating factor (CFS) levels.
Immunology, 1971, *21*, 427-436.

96. METCALF D.
Humoral regulators in the development and progression of leukemia.
Advances in Cancer Res., 1971, *14*, 181-230.

97. METCALF D.
Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies *in vitro.*
J. Cell. Physiol., 1971, *77*, 277-280.

98. METCALF D.
Clinical applications of the agar culture technique for haemopoietic cells.
Rev. Europ. Etudes clin. et biol., 1971, *16*, 855-859.

99. METCALF D.
The nature of leukaemia : neoplasm or disorder of haemopoietic regulation ?
Med. J. Aust., 1971, *2*, 739-746.

100. METCALF D.
Effect of thymidine suiciding on colony formation *in vitro* by mouse hematopoietic cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1972, *139*, 511-514.

101. METCALF D.
The colony stimulating factor (CSF).
A.J.E.B.A.K., 1972, *50*, 547-557.

102. METCALF D.
Human leukaemia : recent tissue culture studies on the nature of myeloid leukaemia.
Brit. J. Cancer, 1973, *21*, 191-202.

103. METCALF D. and BRADLEY T.R.
Factors regulating *in vitro* colony formation by hematopoietic cells.
In : Regulation of hematopoiesis, GORDON A.S., N.Y., Appleton Cent. Crofts, 1970, vol. 1, 187-215.

104. METCALF D., BRADLEY T.R. and ROBINSON W.
Analysis of colonies developing *in vitro* from mouse bone marrow cells stimulated by kidney feeder layers or leukemic serum.
J. Cell. Physiol., 1967, *69*, 93-107.

105. METCALF D., CHAN S.H., GUNZ F. and MOORE M.A.S.
C.S.F. and inhibitor levels in leukemia.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DICKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 298-303.

106. METCALF D., CHAN S., GUNZ F.W., VINCENT P., and RAVICH R.B.M.
Colony-stimulating factor and inhibitor levels in acute granulocytic leukemia.
Blood, 1971, *38*, 143-154.

107. METCALF D. and FOSTER R.
Behavior on transfer of serum stimulated bone marrow colonies.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, *126*, 758-762.

108. METCALF D. and FOSTER R.
Bone marrow colony-stimulating activity of serum from mice with viral-induced leukemia.
J. Nat. Cancer Inst., 1967, *39*, 1235-1245.

109. METCALF D., FOSTER R. and POLLARD M.
Colony-stimulating activity of serum from germ-free normal and leukemic mice.
J. Cell. Physiol., 1967, *70*, 131-132.

110. METCALF D. and MOORE M.A.S.
Haemopoietic cells. North Holland Publish. Cie, Amsterdam, 1971.

111. METCALF D., MOORE M.A.S. and SHORTMAN K.
Adherence column and buoyant density separation of bone marrow stem cells and more differentiated cells.
J. Cell. Physiol., 1971, *78*, 441-450.

112. METCALF D., SHERIDAN J.W., CHAN S.H. and STANLEY E.R.
Tissue origin of CSF and responses to irradiation and bacterial antigens.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DICKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 73-77.

113. METCALF D. and STANLEY E.R.
Quantitative studies on the stimulation of mouse bone marrow colony growth *in vitro* by normal human urine.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1969, *47*, 453-466.

114. METCALF D. and STANLEY E.R.
Serum half life in mice of colony-stimulating factor prepared from human urine.
Brit. J. Haemat., 1971, *20*, 549-556.

115. METCALF D. and STANLEY E.R.
Haematological effects in mice of partially purified colony-stimulating factor (CSF) prepared from human urine.
Brit. J. Haemat., 1971, *21*, 481-492.

116. METCALF D. and WAHREN B.
Bone marrow colony-stimulating activity of sera in infectious mononucleosis.
Brit. Med. J., 1968, *3*, 99-101.

117. METCALF D. and CHAN S.H.
Local and systemic control of granulocytic and macrophage progenitor cell regeneration after irradiation.
Cell Tiss. Kinet., 1973, *6*, 185-197.

118. MEURET G. and HOFFMANN G.
Monocyte kinetic studies in normal and disease states.
Brit. J. Haemat., 1973, *24*, 275-285.

119. MOORE M.A.S. and METCALF D.
Cytogenetic analysis of human acute and chronic myeloid leukemic cells cloned in agar culture.
Int. J. Cancer, 1973, *11*, 143-152.

120. MOORE M.A.S. and WILLIAMS N.
Physical separation of colony stimulating cells from *in vitro* colony forming cells in hemopoietic tissue.
J. Cell. Physiol., 1972, *80*, 195-206.

121. MOORE M.A.S., WILLIAMS N. and METCALF D.
Purification and characterisation of the *in vitro* colony forming cell in monkey hemopoietic tissue.
J. Cell. Physiol., 1972, *79*, 283-292.

122. MOORE M.A.S., WILLIAMS N. and METCALF D.
In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: characterisation of the colony forming cells.
J. Nat. Cancer Inst., 1973, *50*, 603-624.

123. MOORE M.A.S., WILLIAMS N., METCALF D., GARSON O.M. and HURDLE A.D.F.
Control of human leukaemic cell proliferation and differentiation in agar culture.
In : Cell differentiation, HARRIS R., ALLIN P., VIZA D., Proc. first Int. Conf. on cell differentiation, Munksgaard, Copenhagen, 1972.

124. MORLEY A., QUESENBERRY P., BEALMEAR F., STOHLMAN F., Jr., and WILSON R.
Serum colony stimulating factor levels in irradiated germfree and conventional GFW mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1972, *140*, 478-480.

125. NAKEFF A.
Proliferation of megakaryocytes *in vitro*.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DICKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 121-135.

126. NORTHUP J., BULL J. and CARBONE P.P.
Quantitative estimates of granulocyte colony formation *in vitro*.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DICKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 324-333.

127. NORTHUP J., BULL J.M. and CARBONE P.P.
Proliferative activity of human granulocytes as estimated quantitatively by *in vitro* colony formation.
J. Nat. Cancer Inst., 1972, *48*, 629-637.

128. NOWELL P.C. and HUNGERFORD D.A.
A minute chromosome in human chronic granulocytic leukaemia.
Science, 1960, *132*, 1497.

129. OTSUKA A., ROBINSON W.A. and ENTRINGER M.A.
Subcellular localization and release of colony stimulating activity by human granulocytes *in vitro*.
Proc. Sixth Leucocyte Culture Conference, SCHWARZ M.R., Acad. Press, N.Y., 1972, 37-53.

130. PARAN M., ICHIKAWA Y. and SACHS L.
Feedback inhibition of the development of macrophages and granulocyte colonies. II. Inhibition by granulocytes.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1968, *62*, 81-87.

131. PARAN M. and SACHS L.
The continued requirement for inducer for the development of macrophage and granulocyte colonies.
J. Cell. Physiol., 1968, *72*, 247-250.

132. PARAN M. and SACHS L.
The single cell origin of normal granulocyte colonies *in vitro*.
J. Cell. Physiol., 1969, *73*, 91-92.

133. PARAN M., SACHS L., BARAK Y. and RESNITZKY P.
In vitro induction of granulocyte differentiation in hematopoietic cells from leukemic and non-leukemic patients.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1970, *67*, 1542-1549.

134. PEARSALL N.N. and WEISER R.S.
The macrophage.
Lea and Febiger, Philadelphia, 1970.

135. PIKE B.L. and ROBINSON W.A.
Human bone marrow colony growth in agar-gel.
J. Cell. Physiol., 1970, *76*, 77-84.

136. PLUZNIK D.H. and SACHS L.
The cloning of normal "mast" cells in tissue culture.
J. Cell. Physiol., 1965, *66*, 319-324.

137. PLUZNIK D.H. and SACHS L.
The induction of clones of normal mast cells by a substance from conditioned medium.
Exp. Cell Res., 1966, *43*, 553-563.

138. QUESENBERRY P., HALPERN J., RYAN M. and STOHLMAN F., Jr.
The role of endotoxin in colony-stimulating factor (CSF) elevations seen after irradiation.
Blood, 1972, *40*, 949. (abst.)

139. QUESENBERRY P., MORLEY A., STOHLMAN F., RICKARD K., HOWARD D. and SMITH M.
Effect of endotoxin on granulopoiesis and colony-stimulating factor.
New Engl. J. Med., 1972, *286*, 227-232.

140. RAGAB A.H., GILKERSON E. and LINDSAY M.
The kinetics of colony forming units derived from the bone marrow and peripheral blood cells of children with acute leukemia;an extensive study.
Proc. Am. Ass. Cancer Res., 1973, *14*, 10. (abst.)

141. RICKARD K.A., SHADDUCK R.K., MORLEY A., and STOHLMAN F., Jr.
In vitro and *in vivo* colony formation in the study of granulopoiesis.
In : Hemopoietic cellular proliferation, STOHLMAN F., Grune & Stratton, N.Y., 1970, 232-248.

142. ROBINSON W.A., ATKINS R.C. and PIKE B.
Recovery of leukopoietic activity from organ perfusion medium.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1969, *132*, 431-434.

143. ROBINSON W.A., BRADLEY T.R. and METCALF D.
Effect of whole body irradiation on colony production by bone marrow cells *in vitro*.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, *125*, 388-391.

144. ROBINSON W.A. and KURNICK J.E.
Granulocyte colony formation *in vitro* by bone marrow from patients with granulocytopenia and aplastic anemia.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DIKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 304-306.

145. ROBINSON W.A., KURNICK J.E. and PIKE B.L.
Colony growth of human leukemic peripheral blood cells *in vitro*.
Blood, 1971, *38*, 500-508.

146. ROBINSON W.A., METCALF D. and BRADLEY T.R.
Stimulation by normal and leukemic mouse sera of colony formation *in vitro* by mouse bone marrow cells.
J. Cell. Physiol., 1967, *69*, 83-91.

147. ROBINSON W.A. and PIKE B.L.
Leukopoietic activity in human urine. The granulocytic leukemia.
New Engl. J. Med., 1970, *282*, 1291-1297.

148. ROBINSON W.A. and PIKE B.L.
Colony growth of human bone marrow cells *in vitro*.
In : Hemopoietic cellular proliferation, STOHLMAN F., Grune & Stratton, N.Y., 1970, 249-259.

149. ROBINSON W.A., STANLEY E.R. and METCALF D.
Stimulation of bone marrow colony growth *in vitro* by human urine.
Blood, 1969, *33*, 396-399.

150. RYTOMAA T.
Granulocytic chalone and antichalone.
In : Hemic cells in vitro, FARNES, Williams & Wilkins Cie, Baltimore, 1969, 47-58.

151. RYTOMAA T.
Role of chalone in granulopoiesis.
Brit. J. Haemat., 1973, *24*, 141-146.

152. SANDERS F.K. and BURFORD B.O.
Ascites tumors from BHK 21 cells transformed *in vitro* by polyoma virus.
Nature, 1964, *201*, 786-789.

153. SENN J.
An unusual presentation of acute leukaemia : study by marrow cell culture.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DICKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 341-343.

154. SENN J.S., McCULLOCH E.A. and TILL J.E.
Comparison of colony-forming ability of normal and leukaemic human marrow in cell culture.
Lancet, 1967, *II*, 597-599.

155. SENN J.S. and PINKERTON P.H.
Defective *in vitro* colony formation by human bone marrow preceding overt leukaemia.
Brit. J. Haemat., 1972, *23*, 277-281.

156. SHADDUCK R.K.
Granulocyte stimulating and inhibiting activity from neutrophils (PMN's) = possible dual feedback control of granulopoiesis.
Blood, 1971, *38*, 820 (abst.).

157. SHADDUCK R.K. and NUNNA N.G.
Granulocyte colony-stimulating factor. III. Effect of alkylating agent induced granulocytopenia.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1971, *137*, 1479-1482.

158. SHADDUCK R.K. and NUNNA N.G.
Granulocyte colony-stimulating factor. I. Response to acute granulocytopenia.
Blood, 1971, *38*, 559-568.

159. SHADDUCK R.K., NUNNA N.G. and KREBS J.
Granulocyte colony-stimulating factor. II. Relationship to *in vivo* granulopoiesis.
J. Lab. Clin. Med., 1971, *78*, 53-60.

160. SHERIDAN J.W. and METCALF D.
Studies on the bone marrow colony-stimulating factor (CSF) : relation of tissue CSF to serum CSF.
J. Cell. Physiol., 1972, *80*, 129-140.

161. SHERIDAN J.W. and STANLEY E.R.
Tissue sources of bone marrow colony-stimulating factor.
J. Cell. Physiol., 1971, *78*, 451-460.

162. STANLEY E.R.
Physico-chemical characteristics of colony-stimulating factor.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DICKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 26-30.

163. STANLEY E.R., BRADLEY T.R. and SUMMER M.A.
Properties of the mouse embryo conditioned medium factor (s) stimulating colony formation by mouse bone marrow cells grown *in vitro*.
J. Cell. Physiol., 1971, *78*, 301-318.

164. STANLEY E.R., and HARRIS D. *
In : Cell differentiation, HARRIS R., ALLIN P. and VIZA D., Munksgaard, Copenhagen, 1972, 272-276.

165. STANLEY E.R., McNEILL T.A. and CHAN S.H.
Antibody production to the factor in human urine stimulating colony formation *in vitro* by bone marrow cells.
Brit. J. Haemat., 1970, *18*, 585-590.

166. STANLEY E.R. and METCALF D.
Partial purification and some properties of the factor in normal and leukaemic human urine stimulating mouse bone marrow colony growth *in vitro*.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1969, *47*, 467-483.

167. STANLEY E.R. and METCALF D.
The molecular weight of colony-stimulating factor (CSF).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1971, *137*, 1029-1031.

168. STANLEY E.R. and METCALF D.
Enzyme treatment of colony-stimulating factor; evidence for a peptide component.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1971, *49*, 281-290.

169. STANLEY E.R., METCALF D., MARITZ J.S. and YEO G.F.
Standardized bioassay for bone marrow colony-stimulating factor in human urine : levels in normal man.
J. Lab. Clin. Med., 1972, *79*, 657-668.

170. STANLEY E.R., ROBINSON W.A. and ADA G.L.
Properties of the colony-stimulating factor in leukaemic and normal mouse serum.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1968, *46*, 715-726.

171. STEPHENSON J.R., AXELRAD A.A., McLEOD D.L. and SHREEDE M.M.
Induction of colonies of hemoglobin synthesing cells by erythropoietin *in vitro*.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1971, *68*, 1542-1546.

172. STOHLMAN F., Jr.
The identity of the committed stem cell and its regulation.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DICKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, 1972, Rijswijk, 109-120.

* Purification and properties of human urinary colony stimulating factor (CSF)

173. STOHLMAN F., Jr. and QUESENBERRY P.J.
Colony-stimulating factor and myelopoiesis.
Blood, 1972, *39*, 727-732.

174. SULTAN C.
Intérêt des cultures sur agar dans les leucémies.
Société Française d'Hématologie – Strasbourg - 11 novembre 1972.

175. SULTAN C.
Intérêt des cultures de moelle dans les dyshématopoïèses.
Séminaire sur les dyshémopoièses, Créteil, 17 mai 1973.

176. TESTA N.G. and LAJTHA L.G.
Some factors affecting survival of C.F.U. and C.F.U.c in culture.
In : In vitro culture of hemopoietic cells, VAN BEKKUM D.W. and DICKE K.A., Radiobiol. Inst. TNO, Rijswijk, 1972, 102-108.

177. TILL J.E. and McCULLOCH E.A.
A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.
Radiat. Res., 1961, *14*, 213.

178. TOUGH I.M., JACOBS P.A., COURT BROWN W.M., BAIKIE A.G. and WILLIAMSON E.R.D.
Cytogenetic studies on bone marrow in chronic myeloid leukaemia.
Lancet, 1963, *I*, 844-846.

179. TRENTIN J.J.
Influence of hematopoietic organ stroma (hematopoietic inductive microenvironments) on stem cell differentiation.
In : Regulation of hematopoiesis, GORDON A.S., Appleton Cent. Crofts, N.Y., 1970, vol. 1, 161-186.

180. TREPEL F. and BEGEMANN H.
On the origin of the skin window macrophages.
Acta Haemat., 1966, *36*, 386-398.

181. VAN FURTH R., COHN Z.A., HIRSCH J.G., HUMPHREY J.H., SPECTOR W.G. and LANGEVOORT H.L.
Le système phagocytaire mononucléaire : nouvelle classification des macrophages, des monocytes et de leurs cellules souches.
Bulletin O.M.S., 1972, *47*, 651-658.

182. VOGLER W.R., MINGIOLI E.S., GARWOOD F.A. and SMITH B.A.
Granulopoietic stem cell regulators in murine urine : alterations in activity after methotrexate.
J. Lab. Clin. Med., 1972, *79*, 379-387.

183. VOLKMAN A.
The origin and fate of the monocyte.
Series Haemat., 1970, *3*, 62.

184. VOLKMAN A. and GOWANS J.L.
The origin of macrophages from bone marrow in the rat.
Brit. J. Exp. Path., 1965, *76*, 62-69.

185. WAHREN B., ECSENYI-GRANSTROM M.
Cell growth regulating factors in viral infections and other diseases.
Exp. Cell Res., 1971, *66*, 396-400.

186. WARNER N.L., MOORE M.A.S. and METCALF D.
A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB/c mice : cytology, karyotype and muraminidase content.
J. Nat. Cancer Inst., 1969, *43*, 963-982.

187. WEINER H.L. and ROBINSON W.A.
Leukopoietic activity in human urine following operative procedures.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1971, *136*, 29-33.

188. WHANG J., FREI E., TJIO J.H., CARBONE P.P. and BRECHER G.
The distribution of the Philadelphia chromosome in patients with chronic myelogenous leukemia.
Blood, 1963, *22*, 664-673.

189. WHITELAW D.M.
Observations on human monocyte kinetics after pulse labelling.
Cell Tiss. Kinet., 1972, *5*, 311-317.

190. WINTROBE M.M.
Clinical Hematology, Lea Febiger Philadelphia, 1961.

191. WORTON R.G., McCULLOCH E.A. and TILL J.E.
Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture.
J. Cell. Physiol., 1969, *74*, 171-182.

192. WU A.M. SIMINOVITCH L., TILL J.E. and McCULLOCH E.A.
Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1968, *59*, 1209-1215.

193. YOFFEY J.M., HUDSON G. and OSMOND D.G.
The lymphocyte in guinea-pig bone marrow.
J. Anat. (London), 1965, *99*, 841.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1. CULTURE SUR AGAR ET GRANULOPOIESE IN VIVO p. 3

1.1. GENERALITES 5

1.1.1. Historique 5
1.1.2. Principe de la méthode 5
1.1.3. Intérêt de la méthode 6

1.2. SCHEMA DE LA GRANULOPOIESE 7

1.2.1. Granulopoïèse normale 7
1.2.2. Système phagocytaire mononucléaire 16

1.3. APPLICATIONS A L'HOMME : LA LEUCEMOGENESE 17

1.3.1. Généralités 18
1.3.2. Théories de la leucémogénèse 19
1.3.3. Intérêt de la culture sur agar dans les leucémies 24

2. CELLULES FORMANT DES COLONIES EN AGAR 25

2.1. NATURE CLONALE DES COLONIES 26

2.2. PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION IN VITRO DE LA C.F.C.-A 27

2.2.1. Nombre et taille des clones cellulaires 29
2.2.2. Aspect morphologique et composition cellulaire 29

2.3. NATURE ET MORPHOLOGIE DE LA C.F.C.-A 33

2.3.1. Nature 33
2.3.2. Morphologie 34

2.4. PROPRIETES DES C.F.C.-A 34

2.4.1. Fréquence 34
2.4.2. Cycle cellulaire 34
2.4.3. Action de diverses substances 35
2.4.4. Hétérogénéité des C.F.C.-A 35
2.4.5. Capacité d'autorenouvellement des C.F.C.-A 36

3. REGULATEURS DE LA GRANULOPOIESE 40

3.1. C.S.F. 41

3.1.1. Définition 41
3.1.2. Source du C.S.F. 42
3.1.3. Dosage 46
3.1.4. Destinée 48
3.1.5. Propriétés physico-chimiques 49
3.1.6. Propriétés biologiques 52

3.2. INHIBITEURS DE LA FORMATION DES COLONIES 59

3.2.1. Techniques de recherche 59
3.2.2. Origine 60
3.2.3. Propriétés physico-chimiques 60
3.2.4. Propriétés biologiques 62

4. MATERIEL ET METHODES 64

4.1. MATERIEL 65

4.1.1. Sujets étudiés 65
4.1.2. Matériel étudié 67

4.2. METHODES 71

4.2.1. Méthode d'étude de la C.F.C.-A 71
4.2.2. Méthode d'étude du C.S.F. 74

5. RESULTATS 82

5.1. C.S.F. URINAIRE 83

5.1.1. Sujets témoins 83
5.1.2. Malades 86

5.2. C.F.C.-A 94

5.2.1. Chez les sujets normaux 94
5.2.2. Les leucémies 97

5.3. RAPPORTS ENTRE LE TAUX DE C.S.F. URINAIRE ET LE NOMBRE DE C.F.C.-A 120

6. DISCUSSION 121

6.1. SYNTHESE DES TRAVAUX ANTERIEURS 122

6.1.1. Substances régulatrices 122

6.1.2. Formation des colonies en agar dans les leucémies 126

6.2. APPORT DES CULTURES EN GEL D'AGAR DANS LA COMPREHENSION DE LA LEUCEMOGENESE 132

6.2.1. Rôle des régulateurs 132

6.2.2. Nature de la cellule leucémique 134

6.2.3. Défaut de différenciation de la cellule leucémique 136

6.2.4. Conclusion du chapître

CONCLUSIONS 139

ABREVIATIONS 143

BIBLIOGRAPHIE 145

S E R M E N T   D ' H I P P O C R A T E

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate.

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobe et méprisé de mes Confrères si j'y manque.

imprimerie dardelet/2